



**GINA MARIA
OLIVEIRA BRITO**

**ESTRATÉGIAS PARA A VALORIZAÇÃO DO
COBERTO VEGETAL DA ILHA DE PORTO SANTO**

**STRATEGIES FOR VALUATION OF VEGETATION
AREAS OF PORTO SANTO ISLAND**



**GINA MARIA
OLIVEIRA BRITO**

**ESTRATÉGIAS PARA A VALORIZAÇÃO DO
COBERTO VEGETAL DA ILHA DE PORTO SANTO**

**STRATEGIES FOR VALUATION OF VEGETATION
AREAS OF PORTO SANTO ISLAND**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Conceição Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação científica da Professora Doutora Celeste Coelho, Professora Catedrática do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Dedico esta Tese aos meus Pais e à Ilha que me viu nascer...

“O Porto Santo é uma Ilha de paradoxos. ... A Ilha devora-se a si própria. A chuva traz, partícula a partícula, o monte para o vale, espalha-o pelas alagoas ou lança-o no mar – tremenda tarefa de planificação que só verá termo quando a água correr impotente por sobre a rocha descarnada.”

Vieira Natividade, 1945, sobre a Ilha de Porto Santo,
em “O fomento da fruticultura na Madeira”

o júri

presidente / president:

Prof. Doutor Joaquim Manuel Vieira

professor catedrático do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro

vogais / members:

Prof. Doutora Olinda da Conceição Pinto Carnide

professora catedrática do Departamento de Genética e Biotecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Doutora Celeste de Oliveira Alves Coelho

professora catedrática do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro (co-orientadora)

Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares

professor catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos

professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (orientadora)

Prof. Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto

professor auxiliar com agregação do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Miguel Pinto Silva Meneses Sequeira

professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade da Madeira

Prof. Doutor António José Dinis Ferreira

professor adjunto do Departamento de Ciências Exactas e do Ambiente da Escola Superior Agrária de Coimbra do Instituto Politécnico de Coimbra

agradecimentos

Esta Dissertação resulta do trabalho desenvolvido ao longo de cinco anos entre os Departamento de Biologia (Laboratório de Biotecnologia e Citômica), e de Ambiente e Ordenamento da UA e as Ilhas de Porto Santo e da Madeira. Em cada um destes locais o apoio, a colaboração, a confiança e amizade que encontrei, das várias pessoas com quem me cruzei ao longo deste tempo, foram fundamentais para que esta Dissertação se tornasse uma realidade.

Assim, gostaria de manifestar os meus profundos agradecimentos a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram, ajudaram e estimularam a realização desta dissertação, salientando:

A Professora Doutora Conceição Santos, para mim a São, orientadora desta dissertação. Agradeço, em primeiro lugar, todo o interesse e empenho que sempre manifestou pela Ilha de Porto Santo, e por depositar confiança e acreditar nas capacidades desta “portossantense” fazendo valer que conseguiria levar a bom porto um longo trabalho que teve início em 1998 com o meu Mestrado. Agradeço as ideias, sugestões e críticas construtivas que foram norteando este trabalho e que contribuíram significativamente para a qualidade desta Dissertação. Por último, quero ainda expressar a profunda estima que tenho pela São e pela amizade que nos une.

A Professora Doutora Celeste Coelho, co-orientadora desta dissertação. Agradeço, ter aceite a orientação científica deste trabalho, bem como, o apoio, as sugestões, as críticas construtivas e as correcções relevantes feitas durante a orientação. Agradeço, ainda, a disponibilidade e consideração reveladas ao longo destes anos de trabalho.

As instituições que proporcionaram apoio financeiro e/ou logístico e às quais estou profundamente reconhecida, nomeadamente: a Secretaria Regional da Educação e Cultura e a Direcção Regional de Florestas da Região Autónoma da Madeira, a Câmara Municipal de Porto Santo, na pessoa do seu Presidente Roberto Silva, e a Porto Santo Verde, E.E.M.

Os Exmos Senhores: Secretário Regional do Ambiente e Recursos Naturais, Director Regional de Florestas, Director do Jardim Botânico da Madeira, Presidente da Câmara Municipal de Porto Santo, Presidente da Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo, Eng.^o Rui Vieira e Mestre Florestal Luís Silva, que gentilmente acederam e se disponibilizaram para responderem ao inquérito por entrevista e pela forma atenciosa com que me receberam. E os residentes e visitantes da Ilha de Porto Santo que se disponibilizaram para responderem ao inquérito por questionário.

O Dr. Roberto Jardim, Director do Jardim Botânico da Madeira, pela disponibilidade prestada para discussão de alguns aspectos relacionados com as espécies em estudo. Agradeço ainda o apoio logístico e disponibilização de recursos humanos para a obtenção de material vegetal.

O Eng.^o Paulo Freitas pela disponibilização de informação relacionado com os trabalhos de beneficiação e arborização da Ilha de Porto Santo da responsabilidade da Direcção Regional de Florestas.

agradecimentos (cont.)

Os Mestres Florestais Sr. Luís Silva e Sr. Martinho Oliveira do Posto dos Serviços Florestais de Porto Santo, pela atenção, disponibilidade e prontidão com que sempre me atenderam para a obtenção de material vegetal, bem como pelo apoio e excelente trabalho prestado na transposição das plantas micropropagadas para o campo, e respectivo acompanhamento.

O Armando Costa pela sua ajuda, principalmente, na aclimatização de plantas em estufa, por aspectos que focou de extrema importância para o trabalho, esclarecimento de dúvidas pontuais e, pela camaradagem.

Os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia e Citómica, Ana Sofia Gabriel, Tina Lopes, Ana Capelo, Glória Pinto, João Loureiro, Sónia Silva, Eleazar Rodriguez, Pedro Fernandes, Sílvia Castro, Marta Monteiro e Helena Azevedo, pela amizade e companheirismo, pelas sugestões e saudáveis discussões e, ainda, pelo tempo que partilharam comigo na realização do trabalho experimental.

A Rosa Pinho, pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas relacionadas com a taxonomia das espécies em estudo.

A Sandra Valente, pelo auxílio e os esclarecimentos na utilização do programa informático SPSS – Statistical Package for the Social Sciences.

Os gerentes dos estabelecimentos hoteleiros da Ilha de Porto Santo e o proprietário do Mini Jardim Botânico Quinta das Palmeiras, Sr. Carlos Afonso, que gentilmente autorizaram a distribuição dos inquéritos aos seus clientes (visitantes da Ilha de Porto Santo).

A Teresa, pela amizade e pelas palavras de incentivo para iniciar este Doutoramento e ao longo do trabalho.

A Alexandra, a Paula, e a Susana pela amizade e estímulo que sempre me deram ao longo destes anos.

Por último, não posso deixar de agradecer às pessoas mais importantes na minha vida, e que são o meu suporte emocional:

Aos meus Pais, pela confiança que sempre depositaram em mim, pelo apoio constante e palavras de incentivo ao longo desta caminhada. Agradeço também a eles terem sido os “avós” das minhas “filhotas” (oliveirinhas em aclimatização) na Ilha de Porto Santo.

À minha Família, salientando, a minha irmã Leena e as minhas primas Isabel e Lina pelo apoio e palavras de incentivo e por saberem sempre o que dizer para elevar os ânimos.

E em especial, tenho a agradecer muito ao Luís Daniel, meu companheiro e amigo, pelo carinho, amor, compreensão e muita paciência. Pelo apoio nos bons e nos maus momentos, pela ajuda para ultrapassar os maiores obstáculos, por sempre acreditar que eu seria capaz e por elevar a minha auto estima. A ele agradeço também as sugestões imprescindíveis à realização gráfica da tese, bem como a impressão desta dissertação.

palavras-chave

aclimatização, conteúdo em DNA, cultura in vitro, desertificação, diversidade genética, estudos fisiológicos, marcadores moleculares (SSR), meio de cultura, micropropagação de oliveira, *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, *Olea maderensis*, percepção, ploidia, reflorestação, variação somaclonal

resumo

No presente trabalho desenvolveram-se estudos visando a valorização do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo, através de duas metodologias de investigação complementares: a) preservação e reintrodução na Ilha de uma espécie endémica e em risco do Arquipélago da Madeira (*Olea maderensis*) e de uma espécie naturalizada (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*), recorrendo para o efeito a técnicas de biotecnologia (micropropagação); b) análise da percepção da comunidade local e visitante sobre o fenómeno da desertificação e a valorização do coberto vegetal bem como a sua aceitação relativamente à aplicação de técnicas de biotecnologia (para micropropagar e reintroduzir espécies de oliveira na Ilha) para minimização do processo de desertificação.

A dissertação estrutura-se em quatro partes principais.

A Parte I caracteriza a Ilha de Porto Santo em termos geográficos, geológicos, climáticos, sócio-económicos e do uso do solo. Enquadra, ainda, o problema da desertificação, através da caracterização/evolução do coberto vegetal ao longo dos anos. Finalmente apresentam-se os objectivos gerais deste estudo.

A Parte II centra-se no desenvolvimento de metodologias no âmbito da biotecnologia vegetal para propagação de espécies de *O. maderensis* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, em larga escala. Esta parte está dividida em seis capítulos. O Capítulo II.1 aborda a distribuição geográfica das espécies de oliveira e faz uma revisão bibliográfica dos aspectos mais importantes da micropropagação de oliveira (*O. europaea* L.), principalmente através da micropropagação por estimulação de gomos axilares. No final deste capítulo apresentam-se os objectivos específicos desta investigação. No Capítulo II.2 faz-se a caracterização genética de génotipos de *O. maderensis* do Arquipélago da Madeira através da análise da ploidia e do conteúdo em DNA por citometria de fluxo (FCM) e através da detecção de polimorfismos por análise de microssatélites (SSR). Nesta análise usaram-se ainda outros génotipos, nomeadamente: *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, *O. cerasiformes* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*. Este estudo contribuiu para uma melhor caracterização desta espécie e permitiu a detecção de um nível de ploidia novo no género *Olea* (tetraploidia). O Capítulo II.3 descreve a optimização das condições de cultura in vitro (e.g. desinfecção, meio de cultura e enraizamento) para propagar e preservar a *O. maderensis*. Avalia-se ainda a “performance” dos rebentos in vitro (taxas de crescimento, avaliação da aparência das folhas e estudos fisiológicos), de modo a confirmar a optimização das condições de propagação. Neste capítulo define-se um meio novo (OMG) para propagação desta espécie endémica. O Capítulo II.4 descreve dois protocolos de micropropagação e aclimatização de ambas as espécies (*O. maderensis* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) e a qualidade das plantas (“true-to-type”) é avaliada através da possível ocorrência de variabilidade genética através de FCM (ploidia) e SSRs.

resumo (cont.)

O Capítulo II.5 descreve um protocolo eficiente de aclimatização ao campo de *O. maderensis* e avalia a “performance” das plantas micropropagadas no campo através da análise de parâmetros fisiológicos durante o processo. O Capítulo II.6 apresenta os estudos em curso relativamente às plantas de *O. maderensis* em aclimatização no campo, bem como a introdução de plantas micropropagadas num outro local da Ilha com um maior grau de degradação dos solos. Estas estratégias estão a ser aplicadas juntamente com a DRF-RAM, no âmbito de programas de florestação em curso. Finalmente é realçada a necessidade de estudos semelhantes com outras espécies nativas.

Na Parte III, são apresentados os estudos sobre a percepção da comunidade local relativamente à valorização do coberto vegetal para a minimização dos processos de degradação dos solos/desertificação. A introdução faz o enquadramento teórico sobre o fenómeno da desertificação, particularmente na Ilha de Porto Santo e sobre a percepção social da desertificação. São ainda apresentados os objectivos específicos desta investigação. A metodologia adoptada recorreu à aplicação de inquéritos por questionário à população residente e aos visitantes da Ilha de Porto Santo e ainda a realização de inquéritos por entrevista a algumas entidades e especialistas. Estes estudos permitiram verificar que existe uma nítida consciência da situação de risco da ilha, das medidas tomadas e a tomar e da premência da resolução do problema. Face ao recurso de estratégias alternativas envolvendo biotecnologia, e apesar de existir algum desconhecimento, concluiu-se ainda que a população manifesta aceitação, desde que essas estratégias valorizem o coberto vegetal e, assim, ajudem a combater a degradação biofísica dos solos. Finalmente são apresentadas as conclusões e algumas recomendações.

Na Parte IV apresentam-se as conclusões gerais e perspectivas futuras, onde o potencial ambiental destas oliveiras bravas micropropagadas é destacado, bem como é considerado o alargamento da aplicação destas estratégias a outras espécies indígenas em risco, nesta Ilha (e noutros locais). São ainda resumidas as principais visões da população e das entidades e dos especialistas que poderão contribuir para apoiar a elaboração de medidas de mitigação e prevenção no combate ao processo de degradação dos solos/desertificação em curso.

keywords

acclimatization, culture medium, in vitro culture, desertification, genetic diversity, forestation, nuclear DNA content, olive micropropagation, *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, *Olea maderensis*, perception; physiologic studies; ploidy; somaclonal variation; SSR markers

abstract

In this work we developed studies for the valuation of vegetation areas of Porto Santo Island, through the definition of two complementary research methodologies: a) the preservation and reintroduction of an endemic endangered species of Madeira Archipelago (*Olea maderensis*) and a naturalized species (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*), using biotechnology techniques (micropropagation); b) perception analysis of the local community and visitors about the desertification phenomenon and of the valuation of vegetation areas and their acceptance on application of biotechnology techniques (for micropropagate and reintroduce olive species in the Island) in order to minimize the desertification process.

This dissertation is structured in four main parts:

Part I makes a brief geographic, geologic, climatic, socioeconomic and land use characterization of Porto Santo Island. It also describes the desertification problem and characterizes the vegetation areas evolution through the years. Finally, the general objectives of this study are presented.

Part II is focused in the development of plant biotechnology methodologies for propagation of *O. maderensis* and *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*. in large-scale. This part is divided in six chapters. Chapter II.1 refers the botany and geographical distribution of olive species and revises important aspects of olive (*O. europaea* L.) micropropagation, in particular the micropropagation through axillary bud stimulation. At the end of this chapter the research objectives are presented. On Chapter II.2 flow cytometry (FCM) and nuclear microsatellites (SSR) were used to investigate and characterize genotypes of *Olea maderensis* from Madeira Archipelago through the analysis of ploidy levels and detection of polymorphisms. Several genotypes of *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, *Olea cerasiformis* and of *O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea* were also analysed. This study contributed to an even better characterization of these species and enabled the detection of a new ploidy level, tetraploidy, in the *Olea* genus. Chapter II.3 describes the optimization of the in vitro culture conditions (e.g. disinfection, culture medium, rooting) to propagate and preserve *O. maderensis*. It is also described the evaluation of shoot performance (growth rates, leaf colour/abscission and physiological behaviour) in order to confirm the optimization of the culture conditions used. In this chapter it is defined a new medium (OMG) for propagation of this endemic species. On Chapter II.4, we describe the micropropagation and acclimatization protocols for both species (*O. maderensis* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and the quality of plants (true-to-typness) is assessed by evaluating putative genetic variability by FCM (ploidy clonal fidelity) and SSRs. Chapter II.5 describes a successful field acclimatization of *Olea maderensis* and evaluates field performance of micropropagated plants by analysing physiological parameters during the process.

abstract (cont.)

Chapter II.6 presents the ongoing studies concerning *Olea maderensis* plants acclimatization in field, and also the introduction of micropropagated plants in another site with a higher degree of land degradation. These strategies are being undertaken jointly with DRF-RAM, within a forest breeding programme for the Island. Finally it is highlighted the need of further similar studies with other native species.

Part III presents the studies concerning the perception of the local community on the valuation of vegetation areas to minimize the land degradation/desertification process. The introduction presents the desertification phenomenon, particularly in Porto Santo Island, and the social perception of desertification. The specific objectives of this research are also presented. This methodology was carried out through the application of inquiries to residents and visitors of Porto Santo Island and by interviewing some entities and specialists. These studies showed that there is a clear awareness of the hazard situation in the Island, of the measures to be taken and of the urgency of solving the problem. In relation to alternative strategies, such as biotechnology, although some lack of knowledge is recognised, it was concluded that the population accepts them, once they can provide the valuation of vegetation areas and enhance the fighting of land degradation/desertification. Finally, some conclusions and recommendations are presented.

Part IV presents the general conclusions and future prospects, where the environmental potential of micropropagating these wild olives micropropagation is highlighted, and its extension to other native species at risk in this Island (and in other places) is considered. It is also summarized the most important visions of the population and entities and specialists, which may support for mitigation measures to fight the ongoing process of desertification.

Abreviaturas e Siglas

ANOVA – Analysis of variance	½ OMG – Half strength OMG medium
CCD – Convenção de Combate à Desertificação	OMG_{WH} – OMG medium without growth regulators
Chl – Chlorophyll	OMG₄ – Modified OM with 4x the concentrations of FeNaEDTA, MgSO ₄ and MnSO ₄
CP – Cabildo de La Palma	OMG_{4WH} – OMG ₄ medium without growth regulators
CPRSPS – Centro de Processamento de Resíduos Sólidos de Porto Santo	OMG₁₀ – Modified OM with 10x the concentrations of FeNaEDTA, MgSO ₄ and MnSO ₄
DJBM – Director do Jardim Botânico da Madeira	OMG_{10WH} – OMG ₁₀ medium without growth regulators
DKW – Driver Kuniyuki Walnut medium	Op greenh – Open greenhouse
DREM – Direcção Regional de Estatística da Madeira	PANCD – Programa de Acção Nacional de Combate à Desertificação
DRF – Direcção Regional de Florestas Director Regional de Florestas	PCMPS – Presidente da Câmara Municipal de Porto Santo
DW – Dry weight	PGR – Plant growth regulators
EA – Eng.º Agrónomo Reformado da Função Pública	PI – Propidium iodide
Elong – Elongation stage;	PSDPS – Presidente da Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo
F₀ – Basal chlorophyll fluorescence	RAM – Região Autónoma da Madeira
FCM – Flow cytometry / Citometria de Fluxo	RH – Relative humidity
F_m – Maximal chlorophyll fluorescence	RLR – Relative leakage ratio
F_v – Variable component of chlorophyll ($F_v = F_m - F_0$)	SE – Standard error
FW – Fresh weight	SRARN – Secretário Regional do Ambiente e Recursos Naturais
GA₃ – Gibberellic acid	SSRs – Simple sequence repeats / Microssatélites
Greenh – Greenhouse;	UNCCD – United Nations Convention to Combat Desertification / Convenção das Nações Unidas para a Luta contra a Desertificação
GS – Genetic similarity	UNESCO – United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
IAA – Indole-3-acetic acid	V – volum
IBA – Indole butyric acid	W – weight
IE – Inquérito por entrevista	WPM – Woody plant medium
IGA – Investimentos e Gestão da Água, S.A.	WPM_{WH} – WPM medium without growth regulators
In vitro Ac – In vitro Acclimatization;	
INE – Instituto Nacional de Estatística	
IQR – Inquérito por questionário aos residentes	
IQV – Inquérito por questionário aos visitantes	
M plant – Mother plant;	
MF – Mestre Florestal da Estação Florestal de Porto Santo	
MS – Murashige and Skoog medium	
NAA – α-Naphthalene acetic acid;	
NS/NR – Não sabe ou não responde	
OM – Olive medium;	
½ OM – Half strength OM medium	
OM_{WH} – OM medium without growth regulators	
OMG – Modified OM with 2x the concentrations of FeNaEDTA, MgSO ₄ and MnSO ₄	

PREFÁCIO

A presente dissertação descreve os estudos realizados para a valorização do coberto vegetal na Ilha de Porto Santo. Espera-se que estes resultados possam contribuir para minimizar o processo de desertificação que se faz sentir na Ilha, e que necessita de resolução urgente.

Neste sentido, desenvolveram-se duas metodologias de investigação no âmbito de duas áreas científicas, uma relacionada com as ciências biológicas e a outra com as ciências sociais.

Neste contexto, a presente dissertação é apresentada em língua portuguesa (Partes I, III e IV) e em língua Inglesa (Parte II).

As secções em língua portuguesa referem-se à Introdução Geral (Parte I), aos estudos de avaliação da percepção da comunidade (Parte III), e às conclusões e perspectivas futuras (Parte IV). A opção pela redacção destes capítulos em língua portuguesa, prende-se com a premência na resolução do problema, uma vez que a divulgação destes resultados se tornará mais acessível e mais abrangente em termos de público-alvo, podendo ir além da comunidade científica. Por outro lado, facilitará a disponibilização dos resultados, às entidades da Região Autónoma da Madeira, como um instrumento no apoio à tomada de medidas de combate ao fenómeno de degradação dos solos/desertificação, em curso, na Ilha de Porto Santo.

Na Parte II, os capítulos são apresentados em língua Inglesa, e referem-se aos estudos desenvolvidos no âmbito das ciências biológicas, onde se descrevem as metodologias de biotecnologia vegetal para propagar duas espécies de oliveiras bravas, tendo já sido alvo de publicação em revistas científicas internacionais.

ÍNDICE

Júri	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Abreviaturas e Siglas	xi
Prefácio	xii

PARTE I

Introdução Geral

I.1 Caracterização da Ilha de Porto Santo	3
I.1.1 Localização	3
I.1.2 Relevo e Geologia	4
I.1.3 Clima	6
I.1.4 Coberto Vegetal – Registos Históricos	7
I.1.5 Coberto Vegetal Actual	10
I.1.6 Sócio-Economia	13
I.1.7 Uso do Solo	22
I.1.8 Incidências ambientais resultantes do desenvolvimento económico	24
I.1.9 Estratégias de desenvolvimento sustentável	25
I.2 Projecto REI	27
I.3 Objectivos Gerais da Dissertação	30
I.3.1 Estratégias de investigação adoptadas	31
I.4 Estrutura da Dissertação	32
Referências	34

PARTE II

Plant biotechnology applications for propagation and preservation of two olive species of (*Olea maderensis* and *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*)

Capítulo II.1

Introduction

II.1.1 Botany and geographical distribution of <i>Olea europaea</i>	41
II.1.2 Distribution and ecology of <i>Olea maderensis</i>	42
II.1.3 Micropropagation techniques	44
II.1.4 Tissue culture techniques in Olive	45
II.1.2 Research objectives	50
References	52

Capítulo II.2

Genetic characterisation of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers

Abstract	59
II.2.1 Introduction	60
II.2.2 Materials and methods	61
II.2.3 Results and discussion	64
References	70

Capítulo II.3

Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies

Abstract	75
II.3.1 Introduction	76
II.3.2 Materials and methods	77
II.3.3 Results	81
II.3.4 Discussion	87
II.3.5 Conclusions	90
References	91

Capítulo II.4

Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers

Abstract	97
II.4.1 Introduction	98
II.4.2 Materials and methods	99
II.4.3 Results	102
II.4.4 Discussion	109
References	113

Capítulo II.5

Large scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey

Abstract	121
II.5.1 Introduction	122
II.5.2 Materials and methods	123
II.5.3 Results	128
II.5.4 Discussion	137
References	142

Capítulo II.6

Ongoing studies

II.6.1 Current status of <i>Olea maderensis</i> micropropagated plants introduced in 'Pico do Castelo'	147
II.6.2 Introduction of micropropagated plants in 'Pico do Concelho'	149
II.6.3 Future prospects of plants in field	150
II.6.4 Micropropagation studies with other native species	151
References	152

PARTE III

A percepção das comunidades locais relativamente à valorização do coberto vegetal para a minimização dos processos de desertificação

III.1 Introdução	155
III.1.1 Caracterização dos processos de desertificação	155
III.1.2 A desertificação em Portugal	159
III.1.3 Caso particular da Ilha de Porto Santo	160
III.1.4 A participação pública e a percepção na procura de soluções para combater a desertificação	164
III.1.5 Objectivos da investigação	167
III.2 Metodologia desenvolvida	168
III.2.1 Área de estudo e definição do problema	168
III.2.2 Elaboração dos instrumentos de recolha de informação	168
III.2.3 Selecção da amostra	170

III.3 Resultados	173
III.3.1 Caracterização dos inquiridos – Residentes da Ilha de Porto Santo	173
III.3.2 Percepção dos residentes face à desertificação	175
III.3.3 Percepção dos residentes face à valorização do coberto vegetal para o combate ao processo de desertificação	188
III.3.4 Caracterização dos inquiridos – Visitantes da Ilha de Porto Santo	202
III.3.5 Percepção dos visitantes face à desertificação	205
III.3.6 Percepção dos visitantes face à valorização do coberto vegetal para o combate ao processo de desertificação	213
III.3.7 Percepção das entidades e dos especialistas face à desertificação e à importância da valorização do coberto vegetal	218
III.4 Discussão	237
III.4.1 Percepção face à desertificação	237
III.4.2 Percepção face à desertificação na Ilha de Porto Santo (causas, consequências, medidas)	238
III.4.3 Percepção face à valorização do coberto vegetal como combate ao processo de desertificação	243
III.5 Conclusões	248
III.5.1 Algumas recomendações	251
Referências	253

PARTE IV

Conclusões gerais e perspectivas futuras

VI.1 Conclusões gerais e perspectivas futuras	259
--	-----

LISTA DE ANEXOS

ANEXOS

Anexo I – Folheto informativo para utilização em campanhas de sensibilização sobre a micropropagação de oliveira brava

Anexo II – Guião do inquérito por questionário aos residentes da Ilha de Porto Santo (IQR)

Anexo III – Guião do inquérito por questionário aos visitantes da Ilha de Porto Santo (IQV)

Anexo IV – Guião do inquérito por entrevista (IE) efectuada às entidades e aos especialistas

Anexo V – Local de distribuição e número de IQV respondidos

Anexo VI – Preocupações e comentários dos residentes e dos visitantes, no âmbito dos temas abordados nos IQR e nos IQV

PARTE I

Introdução Geral

Parte desta secção foi anteriormente publicada:

Brito G., Gonçalves F., Santos C. (2007). Contributo do Projecto REI na avaliação dos ecossistemas de Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 5-26

I.1 Caracterização da Ilha de Porto Santo

I.1.1 Localização

O arquipélago da Madeira fica situado no Oceano Atlântico, a oeste da Europa Meridional, entre as costas de Portugal e Marrocos e os Arquipélagos dos Açores e Canárias, entre as latitudes aproximadas 32º 31' e 33º 31' e as longitudes aproximadas 16º 30' e 17º 30'. Apresenta uma área total de 796,8 Km² e é formado pela Ilha da Madeira (736 Km²), Ilha do Porto Santo (42,26 Km²) e ainda por dois grupos de Ilhas desabitadas, Desertas (14,2 Km²) e Selvagens (3,6 Km²). O arquipélago ocupa uma posição central no Atlântico oriental, onde conjuntamente com os arquipélagos dos Açores, Canárias e Cabo Verde, constitui a designada região biogeográfica da Macaronésia (Ilhas afortunadas – do grego: makarón = feliz, alegre; nesos = Ilha) (Figura I.1) (Silva 2003).

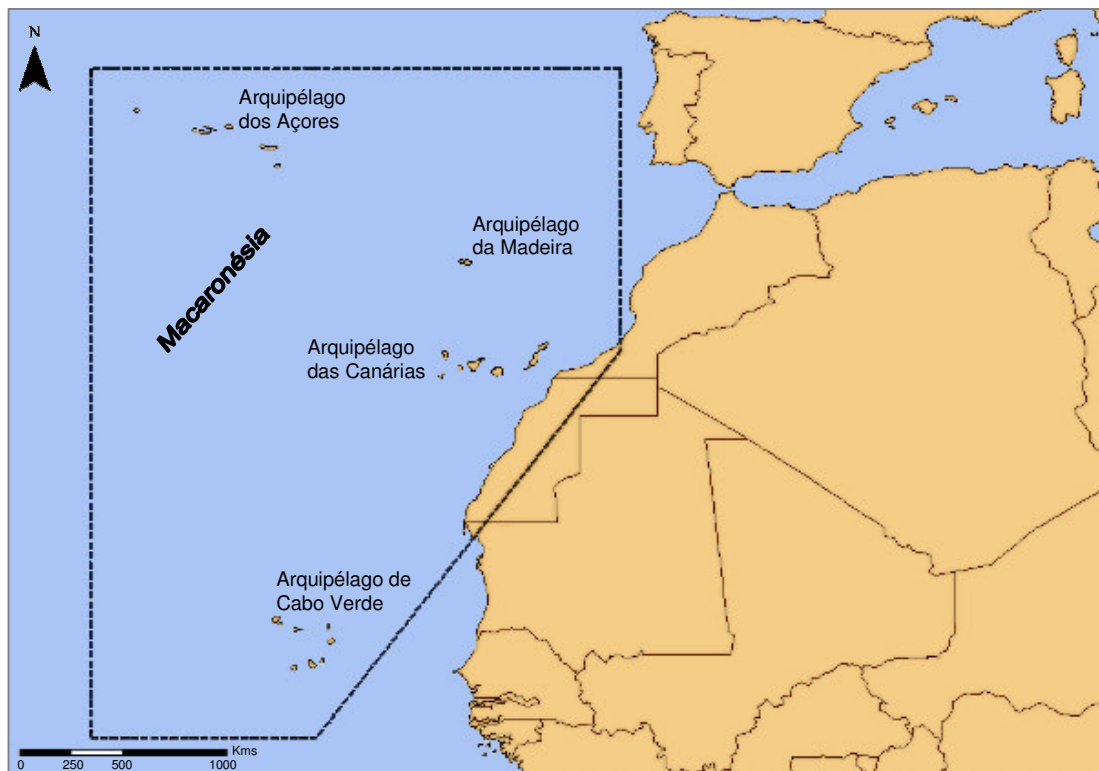


Figura I.1 – Localização do Arquipélago da Madeira no contexto do Atlântico central onde também se posicionam os restantes arquipélagos (Açores, Canárias e Cabo Verde) que constituem o Arquipélago da Macaronésia (adaptado de http://www.emecetus.com/index.php?option=com_content&task=view&id=23&Itemid=47).

I.1.2 Relevo e Geologia

A Ilha de Porto Santo é rodeada por seis ilhéus adjacentes e duas baixas (ilhéu de Baixo ou da Cal, ilhéu de Cima ou do Farol, ilhéu de Ferro, ilhéu da Fonte de Areia, ilhéu das Cenouras, ilhéu de Fora, baixa do Meio e baixa dos Barbeiros) (Silva 2003). Tem 12 km de comprimento, medido na direcção NE-SW e 6 km de largura máxima, medida na direcção N-S, apresentando uma morfologia bastante arrasada que contrapõe ao relevo vigoroso da Ilha da Madeira (Brito 2000).

Apresenta uma forma grosseiramente rectangular, orientando a sua maior dimensão na direcção NE-SW. O seu relevo caracteriza-se pela presença de dois sistemas de picos, estando o de relevo mais importante na zona NE (maiores altitudes correspondem ao Pico do Facho com 517 m e ao Pico Branco com 450m), e outro menos importante no extremo SW da Ilha. Entre os dois sistemas, o terreno apresenta cotas, em geral não excedendo os 150 m de altitude, que vão decrescendo suavemente da costa Norte à costa Sul, encontrando-se um extenso areal de praia entre a Ponta da Calheta e o Porto de Porto Santo (Figura I.2). Paralelamente à praia, em vários pontos separada dela por um cordão irregular de dunas, localiza-se uma faixa de terrenos planos ricos em numerosos e pequenos cursos de água que descem das encostas vizinhas e que chegam a atingir a linha de costa.

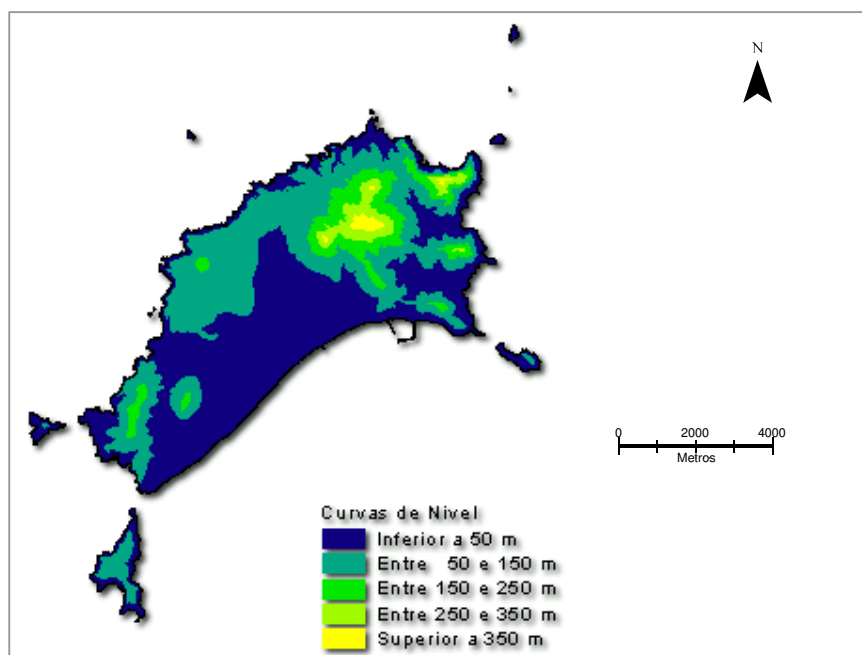


Figura I.2 – Altimetria da Ilha de Porto Santo (adaptado de <http://www.iambiente.pt/atlas/est/index.jsp?zona=madeira> – ‘website’ da Agência Portuguesa do Ambiente – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional).

Os aspectos morfológicos da Ilha são condicionados não só pelo clima como pela sua geologia. A Ilha de Porto Santo é essencialmente de origem vulcânica apresentando também formações sedimentares de certa importância. As formações vulcânicas são constituídas por escoadas de basaltos e andesitos, espessas camadas de tufos vulcânicos e ainda manchas de traquitos e riolitos, brechas vulcânicas e escórias basálticas. Existem também numerosos filões que atravessam as formações vulcânicas constituídas por basaltos, traquitos, andesitos, etc. No que se refere às formações sedimentares, estas são constituídas por rochas sedimentares carbonatadas formadas por calcários miocénicos. São exemplo destas formações, as praias levantadas, os depósitos eólicos areno-calcários, as areias da praia e as dunas actuais (Silva 2003).

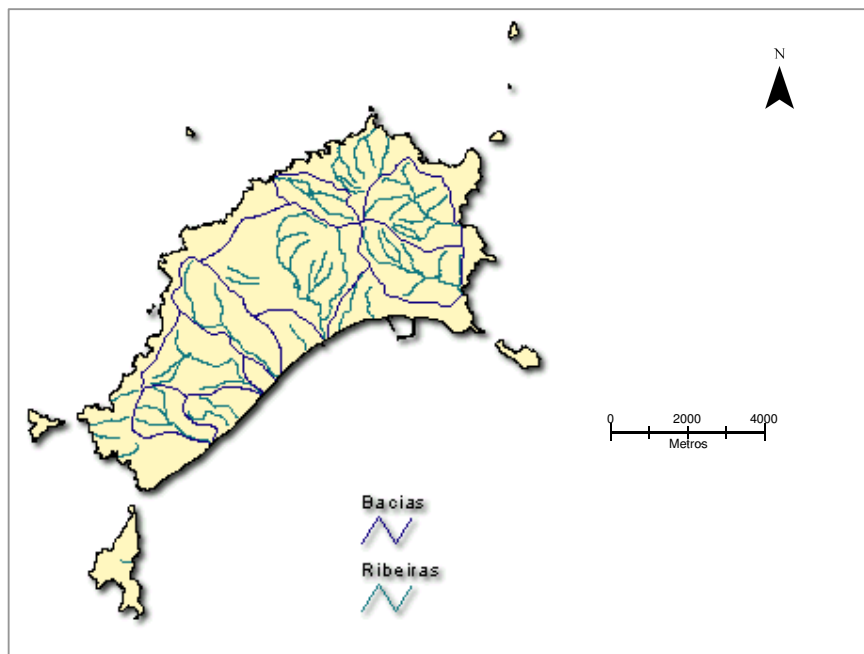


Figura I.3 – Bacias hidrográficas da Ilha de Porto Santo (adaptado de <http://www.iambiente.pt/atlas/est/index.jsp?zona=madeira> – ‘website’ da Agência Portuguesa do Ambiente – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional).

Na figura I.3 estão representadas as bacias hidrográficas da Ilha de Porto Santo, que se formam através dos desníveis dos terrenos que orientam os cursos da água, das áreas mais altas para as mais baixas. Assim, a rede de drenagem superficial dos sistemas montanhosos (natureza vulcânica) é essencialmente do tipo radial de alta densidade, e integra sulcos, ravinas, córregos, barrancos, vales de erosão e vales de deposição, determinando uma activa modelação do terreno. Por outro lado, a zona de cotas inferiores e de relevo suave (natureza sedimentar) apresenta-se bastante

diferenciada, uma vez que a rede de drenagem aproxima-se do tipo dendrítico e a densidade é muito baixa, contudo, os vários cursos de água apresentam leito profundo e margens abruptas e abarrancadas mas a sua acção morfogenética é bastante mais localizada (Brito 2000, Silva 2003). Em qualquer dos casos, a morfologia das linhas de água é determinada pelos fluxos torrenciais que ocorrem após as chuvadas do Inverno, mantendo-se o leito seco ou praticamente seco durante a restante parte do ano.

I.1.3. Clima

A Ilha da Madeira e de Porto Santo possuem um clima extremamente contrastado, sobretudo no que respeita às precipitações, que vai desde o semi-árido ao hiper-húmido, sendo que, no caso da Ilha de Porto Santo, esta apresenta características de uma região semi-árida (Franco 1994, Capelo et al. 2007). A precipitação anual varia entre os 350 e os 400 mm (Figura I.4-A) e os valores de temperatura do ar variam entre os 13 °C e os 25 °C, com médias anuais superiores a 18°C (Figura I.4-B) (Anon. 1999a).

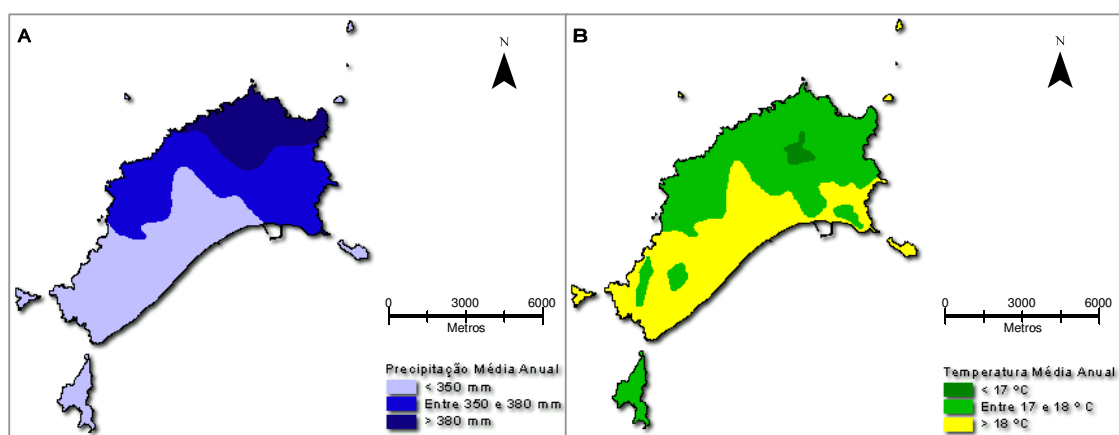


Figura I.4 – A) Precipitação média anual e B) temperatura média anual na Ilha de Porto (adaptado de <http://www.ambiente.pt/atlas/est/index.jsp?zona=madeira> – ‘website’ da Agência Portuguesa do Ambiente – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional).

Os ventos predominantes são do quadrante Norte, com valores médios de velocidade de 19,3 Km/h. A humidade relativa anual média total é de 75%, variando entre 72% no mês de Abril e 78% no mês de Janeiro. Quanto à insolação total média anual é de 2241,5 horas/ano, sendo a média mensal mais elevada (Agosto) de 244,6 horas e a mais baixa (Dezembro) de 132,2 horas. Dada a elevada nebulosidade média mensal verifica-se que a percentagem de insolação média anual não excede o valor de 51%, atingindo em Agosto os 60%. A evaporação média anual caracteriza-se por valores médios mensais

compreendidos entre um mínimo de 122,3 mm (Janeiro) e um máximo de 167,4 mm (Agosto) (Anon. 1999a).

É distinta na Ilha a divisão num semestre seco (Abril a Setembro) e um semestre húmido (Outubro-Março). Não obstante, a Ilha é extremamente deficitária em água, sejam águas superficiais ou subterrâneas, devido principalmente à escassez de chuva, o que leva a uma incipiente e dispersa cobertura vegetal nos dias de hoje, aspectos estes, que se reflectem claramente na sua paisagem.

I.1.4. Coberto Vegetal – Registos Históricos

A Ilha de Porto Santo tem mostrado ser, ao longo da história, um ecossistema extremamente frágil e vulnerável, agravado pela crescente escassez de água doce, degradação do solo e desertificação. São diversas as descrições feitas de como os primeiros portugueses teriam encontrado a Ilha de Porto Santo quando a ela aportaram em 1419. Todos foram unânimes em reconhecer a amenidade da natureza ali apresentada pela viçosa e original vegetação que a revestia (Filipe 2007). Dessa vegetação destacava-se, pela sua importância, vegetação autóctone, nomeadamente, o dragoeiro (*Dracaena draco* (L.) L.), o zimbreiro (*Juniperus phoenicea* L.¹), a urze (*Erica scoparia* L. ssp. *maderincola* McClintock), a oliveira brava ou zambujeiro (*Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco²), o marmulano (*Sideroxylon marmulano* Banks ex Lowe var. *marmulano*) e provavelmente, o loureiro (*Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, J. C. Costa & C. Aguiar) (Pereira 1989, Jardim et al. 1998).

Mas, à semelhança de outros locais, a Ilha de Porto Santo também esteve sujeita à delapidação do seu coberto vegetal e durante cinco séculos caminhou para a desertificação (Quintal 2001). Vários foram os factores que contribuíram para esta delapidação destacando-se, o sobre-pastoreio, o fogo, a proliferação do coelho bravo, os cortes abusivos de árvores e as práticas agrícolas intensas e inadequadas, utilizando-se mobilizações profundas do solo e o recurso à monocultura cerealífera sem pousios, que se traduziram num empobrecimento do solo e subsequente erosão (Filipe 2007). Os picos ficaram escavados e os solos, que cobriam as suas vertentes, foram arrastados até ao mar pelas águas torrenciais durante a ocorrência de aguaceiros. O vento também

¹ É adoptada aqui esta nomenclatura, contudo de acordo com Rivas-Martínez et al. (1993) e Costa et al. (2004), esta espécie refere-se a *Juniperus turbinata* Guss. subsp. *canariensis* (Guyot in Mathou & Guyot) Rivas Mart., Wilpret & P. Pérez.

² É adoptada aqui esta nomenclatura, no entanto, a posição taxonómica desta espécie tem sido alvo de controvérsia, este aspecto será explorado na Parte II – Capítulo II.2.

contribuiu para a destruição da fina camada de solo, ajudando a trazer à superfície a rocha-mãe (Quintal 2001).

O desnudamento do solo e a intensidade dos fenómenos erosivos, tornaram imperativa a intervenção florestal no sentido de se constituírem arvoredos que a defendessem da erosão, e que pudessem melhorar as condições de vida da população, uma vez que a escassez de lenha na Ilha era um problema quase de sobrevivência (Andrada 1990).

Desde o século XV, são feitas referências à necessidade de combater o elevado estado de degradação dos solos e minimizar os processos erosivos. Contudo, não existem referências ao esforço de repovoamento florestal da Ilha, a não ser as plantações (sobretudo com *Cupressus macrocarpa* Hartw.) que remontam ao início do século XX, a cargo do regente-silvícola António Schiapa de Azevedo, as quais incidiram nos cumes dos Picos mais erodidos do maciço nordeste, nomeadamente Pico do Castelo (Figura I.5-A), Pico do Facho e Pico Branco (Andrada 1990, Filipe 2007).

Durante três décadas a obra de António Schiapa de Azevedo encontrou poucos continuadores e só a partir de 1954 recomeçaram com intensidade os trabalhos de repovoamento florestal de Porto Santo (Andrada 1990, Quintal 2001). Estas primeiras intervenções localizaram-se em terrenos públicos (cumes dos picos mais erodidos) onde foi necessário a armação dos terrenos em pequenos socacos, proporcionando ao solo maior retenção das águas e simultaneamente tentar travar a erosão. Esta armação tornou-se numa paisagem característica de alguns locais de Porto Santo como sejam o Pico do Castelo (Figura I.5), Pico do Facho, Pico da Gandaia, Pico Juliana, escarpas do Pico Branco e Terra Chã (Figura I.6) (Andrada 1990, Filipe 2007).

A partir da década de setenta do século XX, os trabalhos de florestação privilegiaram outros locais da Ilha nomeadamente, o Pico de Ana Ferreira, Morenos, Pico do Facho e Serra de Dentro (Quintal 2001, Filipe 2007). O repovoamento florestal foi efectuado recorrendo a espécies exóticas, com destaque para, o pinheiro do Alepo (*Pinus halepensis* Mill.), o pinheiro de Monterey (*Pinus radiata* D. Don), o pinheiro manso (*Pinus pinaster* Aiton) e o cedro de Monterey (*Cupressus macrocarpa*) (Brito 2000).

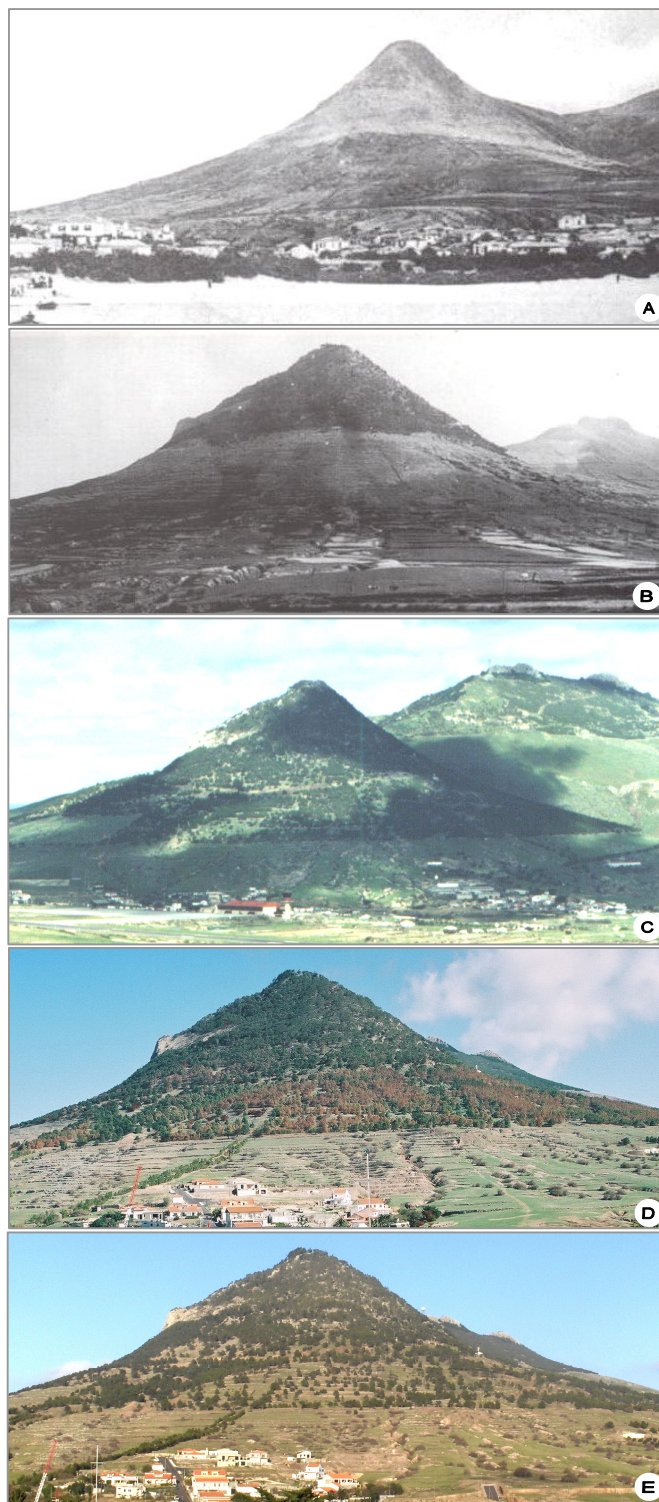


Figura I.5 – Evolução da florestação do Pico do Castelo: A) Início do século XX, pico sem vegetação (solos desertificados) (adaptado de Andrada 1990); B) Década de 50 do século XX, primeira etapa da florestação do pico, a cargo de António Schiapa de Azevedo (adaptado de Andrada 1990); C) Dezembro de 1998 (Pico todo florestado) (adptado de Brito 2000); D) Janeiro de 2005 (morte de Pinheiros); E) Outubro de 2007 (existência de clareiras após o corte das árvores mortas).



Figura I.6 – Vertente sueste do Pico Branco (década de 50 do século XX). Armação dos terrenos em pequenos socacos para arborização, através do árduo trabalho de funcionários dos Serviços Florestais, afim de proporcionar ao solo maior retenção das águas e simultaneamente tentar travar a erosão (adaptado de Andrada 1990).

I.1.5 Coberto Vegetal Actual

A vegetação florestal autóctone original da Ilha de Porto Santo está actualmente reduzida a algumas árvores isoladas e orograficamente protegidas nas encostas da face norte (marmulano, aderno, zambujeiro ou oliveira brava e o zimbreiro) (Capelo et al. 2007). Deste modo, o coberto florestal é, por excelência, um coberto de intervenção humana, contudo, dado que as espécies que melhor se têm adaptado pertencem ao género *Pinus* e *Cupressus*, assiste-se hoje a uma crescente situação de monocultura destas espécies e conseqüente diminuição da biodiversidade do ecossistema (Brito et al. 2007bc, Filipe 2007).

A Direcção Regional de Florestas (DRF), organismo do Governo Regional da Madeira, que tem a seu cargo o sector florestal, tem desenvolvido nos últimos anos esforços na tentativa de preservar/renovar as zonas florestadas e assim, minimizar os problemas de degradação do solo e desertificação. Neste âmbito, a DRF tem apostado na propagação de espécies arbóreas e arbustivas indígenas, que têm sido utilizadas em diversos projectos de florestação (Filipe 2007, Sequeira et al. 2007).

Um dos projectos desenvolvidos pela DRF, (iniciado em finais de 1989), com a participação de uma empresa Dinamarquesa (Danish Land Development Service), visou o desenvolvimento de estudos conducentes à diversificação de espécies florestais. Estes estudos procuraram essencialmente, introduzir na Ilha espécies florestais exóticas adaptadas a condições de aridez e com maior propensão para combate aos processos erosivos e comparar o comportamento das espécies indígenas e/ou naturalizadas adaptadas às condições de Porto Santo, com as essências florestais exóticas introduzidas (Søndergaard 1996, Filipe 2007). Na sequência destes trabalhos, e de acordo com Søndergaard (1996), é importante alertar para os potenciais problemas de introdução de exóticas (e.g. disseminação descontrolada).

Foram ainda tomadas outras medidas por parte do Governo Regional da Madeira, no sentido de valorizar o Porto Santo em termos de recuperação biofísica, onde se destacam: a retirada de gado, o desenvolvimento de projectos de arborização e de beneficiação com a utilização de técnicas específicas, a expropriação de terrenos e, o desenvolvimento de medidas de correcção torrencial das linhas de água (esforço que já vem sendo desenvolvido desde o início dos anos 50 do século XX) (Filipe 2007).

Os trabalhos em curso na Ilha de Porto Santo, correspondem a arborização e regeneração de algumas localidades, com principal incidência nos Picos (Pico do Facho, Pico do Castelo, Pico do Conselho e Pico da Cabrita e ainda o Sítio dos Morenos). Esta arborização está a ser feita essencialmente com as espécies: *Myrica faya* Aiton, *Laurus novocanariensis*, *Olea maderensis*, *Dracaena draco*, *Ceratonia siliqua* L. e *Quercus ilex* L. e simultaneamente têm sido efectuados desramações e desbastes (Freitas 2006 com. pessoal). Contudo, a propagação de algumas destas espécies lenhosas, por vias tradicionais (estacaria e sementeira), tem-se mostrado infrutífera, o que fragiliza os projectos actualmente em curso (Brito 2000, Freitas 2006 com. pessoal).

O processo de desertificação/degradação dos solos, atrás mencionado, e os períodos de seca recorrentes na Ilha, tem levado a perdas qualitativas e quantitativas da flora existente e limitado o restabelecimento da flora nativa.

Saliente-se, por exemplo, o grave problema que recentemente ocorreu no Pico do Castelo, mais acentuado entre os anos de 2004 e 2005, em que se verificou o

desaparecimento de um grande número de pinheiros, cuja principal causa foi essencialmente atribuída à seca, segundo os estudos efectuados da responsabilidade da Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais (Figura I.5-D,E). De acordo com um artigo do Diário de Notícias da Madeira, datado de 8 de Novembro de 2004, sob o título: *“Pico do Castelo está em risco de perder milhares de pinheiros”*, podia-se ler o seguinte: *“Um cenário nunca antes visto está a deixar muito preocupados, quer residentes, quer responsáveis pelos serviços florestais do Porto Santo e entidades regionais que tutelam o ambiente. Tudo porque o Pico do Castelo, o pico mais conhecido da Ilha pelo seu historial e por ter sido o local da primeira reflorestação, está em risco de ver desaparecer milhares de pinheiros. Uma imagem visível a olho nu e que está a afectar a zona abaixo da cota 250 ..., numa área que ronda os vinte e cinco hectares. Uma situação dramática que parece não ter solução à vista. A seca e a doença são, para já, as causas prováveis, apontadas como principais responsáveis por esta catástrofe ambiental que se está a viver na “Ilha dourada”. O facto de a pluviosidade ter sido escassa nestes dois últimos anos terá, ..., contribuído negativamente para o surgimento deste fenómeno e que fez igualmente com que a água captada pelos quatro depósitos existentes no pico simplesmente desaparecesse, estando todos eles neste momento, vazios.”*

Contudo e apesar dos problemas que têm surgido na Ilha, responsáveis pelo desaparecimento da flora nativa e exótica, existem ainda zonas restritas onde restam espécies vegetais prioritárias e raras, dado algumas corresponderem a importantes endemismos e/ou fazerem parte do coberto vegetal nativo, consideradas zonas prioritárias de conservação (Jardim et al. 1998). O Pico Branco é exemplo de uma zona onde restam da floresta nativa, árvores autóctones, nomeadamente a *Heberdenia excelsa* (Aiton) Banks ex DC, *Sideroxylon marmulano*, *Olea maderensis* e *Juniperus phoenicea*, associadas a outros endemismos da Macaronésia, Madeira e Porto Santo (Jardim et al. 1998). Por esta razão o Pico Branco está hoje classificado no âmbito da Rede Natura 2000.

No Arquipélago da Madeira existem 11 Sítios de Importância Comunitária da Rede Natura 2000, que representam 27,5% da sua área total. A Ilha de Porto Santo está representada com cerca de 347 ha, considerados como Sítios de Importância Comunitária, nomeadamente, os Ilhéus de Porto Santo (PTPOR0001, 214 ha), por serem habitats muito importantes, principalmente pelos endemismos presentes e por constituírem áreas de nidificação de aves marinhas e o Pico Branco (PTPOR0002, 133 ha) pela existência de 219 taxa inventariados, dos quais 24% são endémicos, assim como, pelas várias espécies de moluscos terrestres (Sequeira et al. 2007).

Para além de sítios classificados na Rede Natura 2000, a Ilha de Porto Santo está também incluída na Rede de Biótopos CORINE, a Figura I.7 é representativa dos sítios classificados na Ilha.

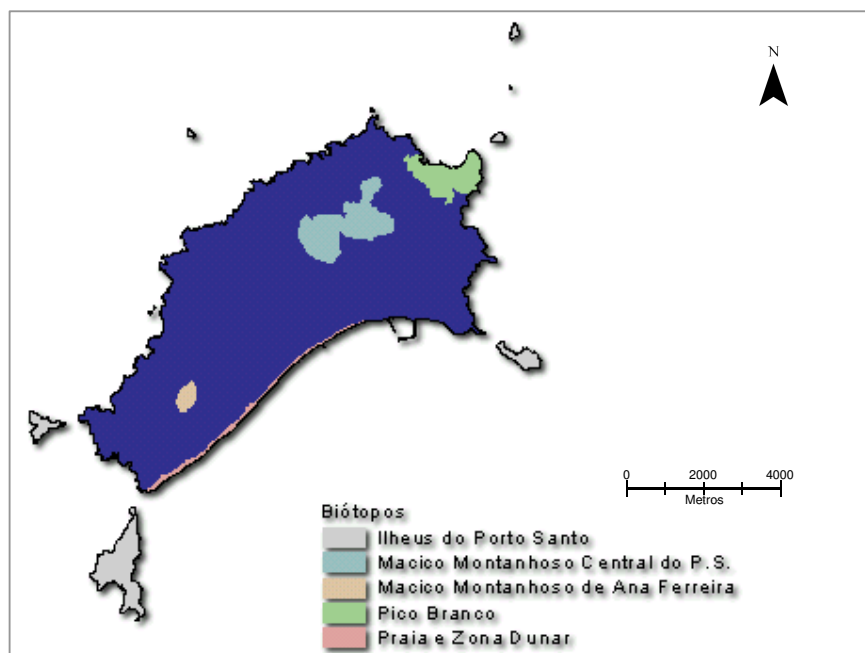


Figura I.7 – Sítios classificados no âmbito da Rede Natura 2000 (Ilhéus de Porto Santo e Pico Branco) e Biótopos Corine (Maciço montanhoso Central de Porto Santo, Maciço montanhoso de Ana Ferreira e Praia e Zona Dunar). (Adaptado de <http://www.iamambiente.pt/atlas/est/index.jsp?zona=madeira> – ‘website’ da Agência Portuguesa do Ambiente – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional).

I.1.6 Sócio-Economia

I.1.6.1. Evolução populacional

A população da Ilha de Porto Santo, segundo o recenseamento de 2001, era de 4474 habitantes (INE 2001).

Analisando a evolução da população durante o último século e início do século XXI (Figura I.8, DREM 2008), é possível verificar que o Porto Santo tem apresentado um dinamismo demográfico apreciável, com um crescimento contínuo desde o princípio do século XX, quase duplicando no período de 1900-1991, sendo o crescimento mais significativo registado a partir da segunda guerra mundial. Contudo, para o período de 1991-2001, registou-se uma variação da população residente de -4,9%, que se traduz em menos 232 habitantes. Os dados mais recentes, de 2007, apontam ainda para um decréscimo embora não muito importante (<http://estatistica.gov-madeira.pt/>).

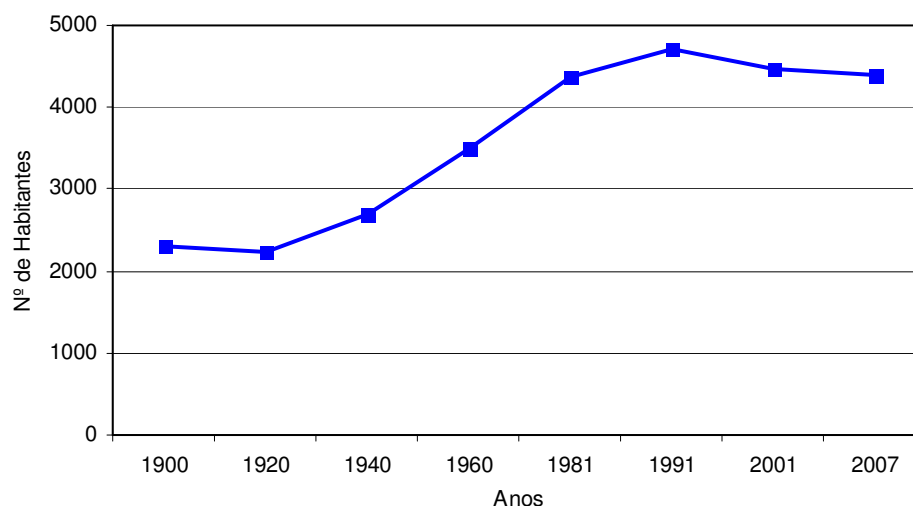


Figura I.8 – Evolução da população residente durante o século XX e início do século XXI na Ilha de Porto Santo (DREM 2008).

Uma das características importantes é o aumento da densidade populacional, que era inferior a 100 habitantes por km² no período de 1900-1960, passando para valores superiores a 100 habitantes por km² a partir de 1981. A densidade populacional calculada para o ano de 2007 é de 103,3 habitantes/km², admitindo como área habitável da Ilha 40,1 km², este resultado identifica o Porto Santo como o concelho com a quarta menor densidade populacional relativamente aos restantes onze concelhos da Região Autónoma da Madeira (RAM) (INE 2001, <http://estatistica.gov-madeira.pt/>).

Tabela I.1 – Taxas de natalidade e mortalidade em 1981, 1991, 2001 e 2007 para o Porto Santo, a RAM e o Continente (DREM 2008, <http://www.ine.pt>)

Zona Geográfica	Taxa bruta de natalidade (0/100)				Taxa bruta de mortalidade (0/100)			
	1981	1991	2001	2007	1981	1991	2001	2007
Porto Santo	21,6	14,2	12,1	10,0	9,6	7,4	11,4	6,2
RAM	17,3	13,6	13,2	11,0	10,0	10,1	11,1	10,4
Continente	15,4	11,6	10,8	9,7	9,8	10,5	10,2	9,8

Relativamente à taxa de natalidade, verifica-se uma tendência decrescente ao longo dos anos, tanto no Continente como nas Ilhas da Madeira e Porto Santo. Este facto poderá explicar a variação da população residente entre 1991 e 2007 (Figura I.8). No que

concerne à taxa de mortalidade, ocorre igualmente um decréscimo ao longo dos anos, embora menos evidente (Tabela I.1).

I.1.6.2 Estrutura populacional

A estrutura da população segundo o sexo, mostra que tanto em 1991 como em 2001, o número de homens é ligeiramente superior ao número de mulheres, embora a variação entre 1991-2001 mostre que terá ocorrido um maior decréscimo de homens do que de mulheres (INE 2001).

Tabela I.2 – Estrutura da população segundo o sexo em 1991 e 2001 na Ilha de Porto Santo, segundo os grupos etários e sua variação entre 1991 e 2001 (INE 2001).

Nº de habitantes	1991	2001	Variação (%) 1991 - 2001
Homens	2371	2241	-5,5
Mulheres	2335	2233	-4,4
Total	4706	4474	-4,9

No que respeita aos grupos etários, a estrutura da população residente (Tabela I.3), mostra uma maior percentagem de jovens e menor percentagem de idosos do que na maioria da RAM, tendo por isso um potencial demográfico elevado, garantindo a continuação do crescimento populacional.

Tabela I.3 – Estrutura da população residente em 1991 e 2001 na Ilha de Porto Santo, segundo os grupos etários e sua evolução entre 1991 e 2001 (INE, 2001).

Grupos Etários	1991	2001	Variação (%) 1991 - 2001
0-14	1211	795	-34,4
15-24	833	786	-5,6
25-64	2289	2428	6,1
65 ou mais	373	465	24,7
Total	4706	4474	-4,9

De acordo com os dados do último recenseamento da população (INE 2001), o cálculo do índice de envelhecimento (rácio entre a população com 65 anos ou mais e população com idade igual ou inferior a 14 anos, vezes 100), resultou para o concelho de Porto Santo num valor de 58, inferior ao valor obtido para a RAM que é de 72, o que se traduz num menor envelhecimento naquela Ilha a favor de uma população em idade activa.

A Tabela I.4 mostra o nível de ensino atingido pela população residente na Ilha de Porto Santo e na RAM. O índice de escolarização da população residente no concelho de Porto Santo, de acordo com o recenseamento de 2001, é muito satisfatório no contexto regional, visto que 38% dos porto-santenses possuíam o ensino base ou seja, o 3º Ciclo do ensino básico (contra apenas 33% dos madeirenses em geral), 23% estavam habilitados com o ensino secundário e cerca de 7% com um nível de instrução elevado (ensino superior). A taxa de analfabetismo em 2001 é também menor em Porto Santo, relativamente à RAM (9,5% contra 12,7%). Pode ainda observar-se que a taxa de analfabetismo diminuiu relativamente a 1991 (9,5% contra 12,3%) (INE 2001).

Tabela I.4 – População residente segundo o nível de ensino atingido em 2001, e taxa de analfabetismo em 1991 e 2001 na Ilha de Porto Santo e na RAM (INE 2001, DREM 2008).

Nível de Escolaridade	2001			
	Porto Santo		RAM	
Nenhum	627		42 701	
1º CEB	1522		87 131	
2º CEB	610		32 370	
3º CEB	676		28 496	
Secundário	723		34 283	
Médio	12		1 159	
Superior	304		18 871	
Total	4 474		245 011	
Taxa de Analfabetismo (%)	1991	2001	1991	2001
	12,3	9,5	15,3	12,7

Pela observação da Tabela I.5, verifica-se que tanto em Porto Santo como na RAM ocorre um importante acréscimo da população activa entre 1991 e 2001. No mesmo período observa-se um decréscimo da população sem actividade económica, nomeadamente da população doméstica, que em 2001 é reduzida para quase metade do existente em 1991. Por outro lado, os dados revelam um acréscimo da população reformada tanto em Porto Santo como na RAM, entre os anos de 1991 e 2001.

Da análise da Tabela I.5 destaca-se ainda, uma redução do número da população estudantil entre 1991 e 2001, este facto poderá estar relacionado com decréscimos da taxa de natalidade tanto em Porto Santo como na RAM ao longo dos anos (Tabela I.1).

Tabela I.5 – População residente, com 15 ou mais anos, segundo a condição perante a actividade económica entre 1991 e 2001 na Ilha de Porto Santo e na RAM (INE 2001, DREM 2008).

Situação Económica		Porto Santo		RAM	
		1991	2001	1991	2001
População com activ. económica	Empregado	1 840	2088	98 042	105 508
	Desempregado	282	124	6 896	5 097
Total		2 122	2 212	104 938	110 605
População sem activ. económica	Estudante	507	393	28 680	18 816
	Doméstica	647	396	33 819	18 863
	Reformado	326	519	27 089	35 170
	Incapacitado perante o trabalho	64	58	5 791	6 600
	Outras	88	101	5 635	8 056
	Total	1 632	1 467	101 014	87 505

I.1.6.3 Distribuição Geográfica da População

A Cidade de Porto Santo³, constitui o principal lugar habitado da Ilha (ver Figura I.9), representando cerca de um terço da população residente. Esta concentração deve-se à sua capacidade atractiva, e à maior oferta de serviços públicos, nas últimas décadas. Os dados da Tabela I.6, mostram que a evolução na última década se deu, acentuando a concentração da população no litoral, entre a Cidade de Porto Santo e o Campo de Baixo, com perda de população na zona central da Ilha, nomeadamente nos sítios do Tanque e do Dragoal (principalmente no período de 1991-2001). Este facto poderá dever-se essencialmente ao maior desenvolvimento da actividade turística no litoral. Os sítios do Farrobo e da Camacha constituem, a Norte, os únicos aglomerados com alguma importância fora da referida zona de concentração (ver Figura I.9). Poder-se-á ainda inferir que ocorreu uma clara transferência dos lugares mais pequenos para os lugares que actualmente contam com mais de 500 habitantes. As variações percentuais mais significativas verificaram-se, para o período de 1991-2001, nos sítios dos Salões e do Farrobo e nos lugares isolados, apresentando os valores 93,8%, 129,3% e 620%, respectivamente.

³Anteriormente denominada por Vila Baleira, foi elevada a categoria de Cidade em 6 de Agosto de 1996.

Com base em dados fornecidos pelo Núcleo de Serviços de Turismo do Porto Santo, durante o período balnear, entre os meses de Junho a Setembro, a população da Ilha pode atingir cerca 15 000 a 20 000 habitantes, valor decorrente da ocupação por turistas de hotéis, pensões, parque de campismo, casas privadas, bem como da estadia de famílias com segunda residência, facto que tem registado um forte aumento nos últimos anos, sobretudo por pessoas oriundas da Ilha da Madeira ou por emigrantes com residência temporária na Ilha (Núcleo de Serviços de Turismo do Porto Santo 2007 com. pessoal).

Tabela I.6 – Evolução da população residente na Ilha de Porto Santo por lugares para os anos de 1981, 1991 e 2001 e sua variação (%) durante os períodos de 1981-1991 e 1991-2001 (DREM 2008).

Lugares	1981	1991	2001	Variação (%)	Variação (%)
				1981-1991	1991-2001
Cidade de Porto Santo (Vila Baleira)	1272	1554	1218	22,2	-21,6
Campo de Baixo	462	511	612	10,6	19,8
Campo de Cima	472	576	672	22,0	16,7
Lapeiras	463	542	560	17,1	3,3
Ponta	122	117	107	-4,1	-8,5
Camacha	423	515	395	21,7	-23,3
Farrobo	137	75	172	-45,3	129,3
Dragoal	300	360	246	20,0	-31,7
Tanque	252	196	127	-22,2	-35,2
Salões	355	130	252	-63,4	93,8
Serra de Fora	107	125	77	16,8	-38,4
Isolados	11	5	36	-54,5	620,0
Total	4376	4706	4474	7,5	-4,9

I.1.6.4 População Estrangeira

As estimativas da população estrangeira a residir legalmente na RAM e em Porto Santo, segundo os dados da Direcção Regional de Estatística da Madeira (DREM), entre os anos de 2004 e 2006 (Anon. 2008b), mostram que ocorreu um grande aumento entre 2005 e 2006, nas duas Ilhas (Tabela I.7). Verifique-se que a população estrangeira

residente no ano de 2006 na Ilha de Porto Santo, representa cerca de 4% da totalidade da população residente. A razão deste aumento deveu-se à conversão das Autorizações de Permanência, concedidas em 2001, em Autorizações de Residência. Os países de proveniência de estrangeiros que mais solicitam o estatuto de residente são, por ordem de importância: Ucrânia, Moldávia, Roménia e Brasil (Anon. 2008b). Deste modo, é previsível uma tendência crescente da população residente, considerando o crescimento de cidadãos estrangeiros que solicitam estatuto de residente na Ilha de Porto Santo. A continuidade desta tendência de crescimento nos próximos anos, perspectiva provavelmente algumas mudanças sócio-culturais a médio e a longo prazo na sociedade porto-santense.

Tabela I.7 – População estrangeira que solicitou estatuto de residente entre os anos 2004-2006 para a Região Autónoma da Madeira e Porto Santo (Anon. 2008b, <http://estatistica.gov-madeira.pt/index.php>).

Zona Geográfica	População estrangeira que solicitou estatuto de residente		
	2004	2005	2006
Porto Santo	15	28	195
RAM	655	526	1 912

I.1.6.5 Emprego e Actividades Económicas

No último recenseamento da população, a estrutura do emprego por sectores de actividade, é definida de acordo com a Classificação Portuguesa das Actividades Económicas (CAE – Rev.2). Deste modo, a designação CAE 0 refere-se ao Sector Primário - Agricultura, Produção Animal, Caça, Silvicultura e Pesca; a CAE 1-4 refere-se ao Sector Secundário - Indústria, Electricidade, Gás, Água e Construção; e a CAE 5-9 refere-se ao Sector Terciário - Comércio e Serviços. Analisando os resultados obtidos no recenseamento de 2001 (Tabela I.8, INE 2001) pode verificar-se que população economicamente activa e empregada na Ilha de Porto Santo, era aproximadamente metade da população total. A taxa de actividade (relação entre a população economicamente activa e a população total) foi de 49,4% em 2001, o que revela um aumento de cerca de 4% relativamente a 1991. Ao nível da RAM, Porto Santo, o Funchal e Santa Cruz foram os conselhos que registaram as taxas de actividade mais elevadas (49,9% no Porto Santo contra 45,1% na RAM) (INE 2001).

Os dados dos Censos de 2001, permitem ainda inferir, sobre a potencialidade da mão-de-obra da população de Porto Santo, através da análise do índice de

rejuvenescimento da população activa (rácio entre a população com 20-29 anos e a população com 55-64 anos, vezes 100). Deste modo, Porto Santo apresenta um valor de 177 contra 173 na RAM, sendo estes dados reveladores de que o número de indivíduos em início de vida activa é mais do que suficiente para substituir aqueles que se encontram no final da mesma. Esta constatação é muito importante do ponto de vista económico (INE 2001, Silva 2003).

De salientar ainda que ocorreu um decréscimo na taxa de desemprego tanto na RAM como em Porto Santo, tendo contudo sido mais acentuado na Ilha de Porto Santo, pois diminuiu em mais de metade entre 1991 e 2001.

Tabela I.8 – População residente economicamente activa e empregada em 1991 e 2001, segundo o ramo de actividade e taxas de actividade e desemprego em 1991 e 2001 na Ilha de Porto Santo e na RAM (INE 2001).

Zona Geográfica	Anos	População economicamente activa empregada							Taxa de Actividade (%)	Taxa de Desemprego (%)
		Sector Primário (CAE 0)		Sector Secundário (CAE 1-4)		Sector Terciário (CAE 5-9)		TOTAL		
		N	%	N	%	N	%			
Porto Santo	1991	136	8,5	426	26,6	1040	64,9	1602	45,1	13,3
	2001	31	1,5	486	23,3	1571	75,2	2088	49,4	5,6
RAM	1991	16 020	16,3	26 133	26,7	55 880	57,0	98 033	41,1	6,47
	2001	8 888	8,4	26 730	25,3	69 890	66,3	105 508	45,1	4,61

A quase totalidade dos empregos está localizada na parte Sul da Ilha, com destaque para a Cidade de Porto Santo, que concentra os serviços administrativos, e os sítios do Campo de Cima e Campo de Baixo. Consequentemente estas são as principais zonas geradoras de movimentos e tráfegos de pessoas, veículos e mercadorias. Sendo que, o aeroporto e o porto de abrigo, são os principais pólos geradores de tráfegos de pessoas, sobretudo no período estival (Figura I.9, Anon. 1999b).

O sector primário da Ilha compreende fundamentalmente a agricultura, a pecuária, a caça, a silvicultura e a pesca. Contudo, este sector representa uma expressão muito reduzida na estrutura económica da Ilha, uma vez que, a superfície agrícola útil representa menos de 10% da superfície da Ilha (ver Figura I.9), consequência das suas características topográficas e da natureza e características dos solos. Praticamente a vitivinicultura é a única actividade agrícola que apresenta ainda alguma expressão, embora tenha sido drasticamente reduzida, ao longo dos tempos, principalmente devido á

construção do aeroporto (zona centro ocidental da Ilha), que cobriu substancialmente a melhor área de plantação de vinha (Silva 2003). Também a actividade piscatória, apesar de ser permanente é pouco expressiva. Apesar do quantitativo de pesca descarregada ser suficiente para as necessidades da população residente e turística, não chega para alimentar qualquer actividade comercial ou transformadora visando a venda a outras regiões (Anon. 2008a).

Estes factos explicam o decréscimo de população ligada ao sector primário (Tabela I.8), sendo que, na última década, não chega a assegurar 2% dos empregos. Em contrapartida, verificou-se um aumento dos sectores secundário e terciário relativamente a 1991.

No passado, no âmbito do sector secundário, as actividades mais importantes para a economia da Ilha e, presentemente abandonadas, foram a exploração de águas minero medicinais, extracção de calcário e calcoarenito e fabrico de conservas de peixe (Silva, 2003). Actualmente o sector secundário compreende algumas pequenas indústrias relacionadas como energia, água e construção civil e obras públicas. A actividade industrial encontra-se essencialmente ligada à existência de pequenas oficinas, empresas de construção civil, extracção de areias, e extracção e transformação de pedra para produção de britas e rocha ornamental (Silva 2003). Assim sendo, este sector representava em 2001, 23,3% da população empregada. Saliente-se ainda, que o sector secundário tem vindo a aumentar nestas últimas décadas, principalmente através da construção civil e obras públicas e após a criação em 1997, da Operação Integrada de Desenvolvimento (OID) do Porto Santo (Resolução do Governo Regional da Madeira 1809/97) e da constituição em 1999, da Sociedade de Desenvolvimento do Porto Santo (Decreto Legislativo Regional nº 16/99/M) (Silva 2003).

O sector terciário está representado na Ilha pela administração pública, a educação, a saúde e acção social, as actividades imobiliárias, a intermediação financeira e seguros, os transportes e actividades conexas, os hotéis e restaurantes, o comércio e serviços ligados à actividade turística. Este sector era ocupado por cerca de 75,2% da população economicamente activa em 2001, em actividades ligadas sobretudo à administração pública e ao turismo (Tabela I.8). É possível verificar ainda, que ocorreu uma variação de cerca de 10% entre 1991 e 2001, uma vez que em 1991 este sector era representado por apenas 64,9% da população activa. De acordo com dados recentes da Direcção Regional do Trabalho da RAM (Anon. 2006), no que respeita à estrutura do mercado de trabalho, verifica-se que a actividade dos serviços é a mais dinâmica em termos empregadores. Contribuem para isso, com maior expressão, os ramos do comércio, hotelaria e restauração, evidenciando a importância da actividade turística na Ilha, actualmente e no

futuro. Assim sendo, verifica-se que o sector de serviços na Ilha é dominado pela importância do turismo que comanda as demais actividades, nomeadamente o comércio.

Em relação aos transportes, a sua importância deve-se principalmente, ao movimento aéreo e marítimo entre a vizinha Ilha da Madeira.

I.1.7. Uso do Solo

A ocupação do território na Ilha de Porto Santo (Figura I.9) apresenta uma superfície agrícola útil que ocupa cerca de 413 ha, o que corresponde a menos de 10% da superfície total. Por outro lado, a superfície florestal é também relativamente reduzida (Tabela I.9, Anon. 2000), apesar dos notáveis esforços de florestação que, desde há vários anos, têm sido realizados com êxito pela DRF (ver secção I.1.5). Saliente-se ainda, que recentemente foi construído o campo de golfe, definido na Carta de Uso do Solo como “Área Verde Urbana”, e ocupa uma área de terreno superior a 1 800 000 m².

Tabela I.9 – Ocupação florestal do solo na Ilha da Madeira e na Ilha de Porto Santo, segundo dados da Direcção Regional de Florestas relativos ao ano de 1998 (adaptado de Anon. 2000).

Tipo de Floresta / Incultos	Porto Santo		RAM	
	Área [ha]	%	Área [ha]	%
Floresta indígena	0	0,00	16 350	22,18
Floresta exótica	600	14,96	13 420	18,21
Incultos	1 910	47,63	20 000	27,14
Total	4 010	100,00	73 700	100,00

Em relação ao tecido urbano, este adquire já algum significado, embora se encontre disperso e degradado, devido ao crescimento anárquico gerado à margem da produção de solo urbano organizado. As infra-estruturas rodoviárias são constituídas por 14 km de estradas e cerca de 23 km de caminhos. Contrariando o panorama modesto atrás exposto, a Ilha de Porto Santo dispõe de excelentes infra-estruturas aeroportuárias e portuárias que facilitam o acolhimento de turistas e visitantes e o consequente desenvolvimento do turismo (Anon. 2008a).

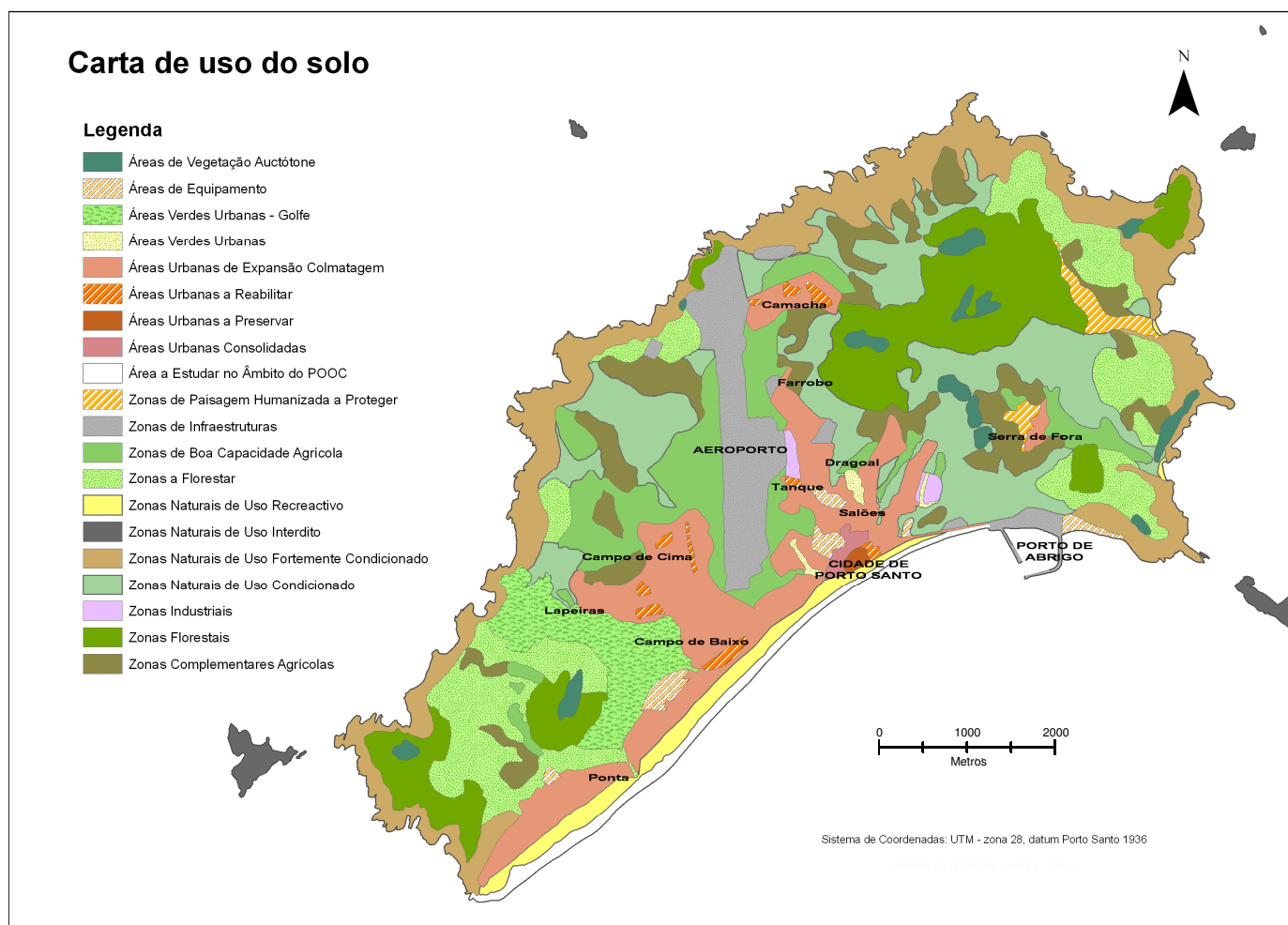


Figura I.9 – Carta de Uso do Solo da Ilha de Porto Santo e localização dos principais lugares/sítios habitacionais da Ilha (Adaptado de Anon. 1999b e Brito et al. 2007a).

I.1.8. Incidências ambientais resultantes do desenvolvimento económico

As reduzidas dimensões e os recursos limitados têm condicionado o desenvolvimento da Ilha de Porto Santo, mas por outro lado o ambiente oceânico e costeiro revestem-se de uma importância estratégica e constituem um valioso recurso para o desenvolvimento (Anon. 2000).

Actualmente, o Porto Santo atravessa um processo de grande desenvolvimento económico, que se traduz num maior crescimento demográfico, principalmente no que se refere à evolução da actividade turística (ver secções anteriores). A tabela I.10 apresenta os indicadores da evolução da actividade turística nos últimos anos, onde se verifica uma tendência para o aumento do número de turistas, do nº de dormidas e da taxa de ocupação-cama na Ilha.

Tabela I.10 – Indicadores da evolução da actividade turística em estabelecimentos hoteleiros no Concelho de Porto Santo (adaptado de <http://estatistica.gov-madeira.pt/index.php>).

Total anual	2004	2005	2006	2007
Nº de Turistas	58 040	53 771	58 454	54 322
Nº de Dormidas	216 140	200 570	233 649	253 284
Taxa de ocupação-cama	41,9%	38,7%	45,1%	48,0%

Neste sentido, os riscos de uma evolução descontrolada do investimento no imobiliário “turístico” e de segunda residência, incentivada pela criação de maior acessibilidade tanto aérea como marítima, tendem a perturbar o já de si frágil equilíbrio biofísico da Ilha e dos seus valores paisagísticos, mas sobretudo o equilíbrio social existente. Torna-se portanto imperioso, compatibilizar o desenvolvimento previsível com a protecção da natureza, num território com fortes condicionantes biofísicas e ecológicas, determinando a necessidade de análise, planeamento e ordenamento prospectivo dos aspectos sócio-económicos e urbanísticos, para prevenir a ocorrência de disfuncionalidades no território (Anon. 2000).

Na óptica da política de ambiente, actualmente em curso na RAM, é defendida a salvaguarda dos solos mais produtivos, bem como a recuperação e conservação do coberto vegetal para combater a erosão, que hoje é reconhecida como um dos grandes problemas ambientais em Ilhas como Porto Santo, com consequências relevantes ao nível do ciclo hidrológico e da paisagem (Anon. 2000).

I.1.9. Estratégias de desenvolvimento sustentável

Considerando o exposto na secção anterior, é importante salientar a preocupação por parte das entidades responsáveis (e.g. Governo Regional da Madeira, Câmara Municipal de Porto Santo, Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo) com o desenvolvimento económico-ambiental da Ilha, de modo a permitir a afirmação da sua sustentabilidade. Neste sentido, têm sido tomadas medidas que visam a preservação do ambiente da Ilha de Porto Santo. De seguida destacam-se algumas das medidas mais importantes, nomeadamente:

A) Gestão das águas na Ilha da responsabilidade da empresa Investimentos e Gestão da Água, S.A. (IGA), que tem por objecto, em regime de concessão, a exploração do Sistema Regional de Gestão e Abastecimento de Água da Madeira. No âmbito das suas actividades, a IGA é responsável pela dessalinização, distribuição de água em alta e baixa, irrigação agrícola, drenagem e destino final supramunicipal das águas residuais urbanas na Ilha de Porto Santo (Anon. 2000). Neste contexto acresce dizer, que apesar da construção de obras hidráulicas, visando a captação das escorrências e águas superficiais (de que são exemplo as barragens e a existência de levadas, numa extensão aproximada de cerca de 10 km), houve a necessidade de recorrer à dessalinização da água do mar, a qual cobre, actualmente, cerca de 90% do consumo de água. O consumo no Verão chega a ser quase duplo em relação ao Inverno. Os recursos provenientes da reciclagem de águas residuais não têm neste momento significado prático prevendo-se, no entanto, o seu uso para efeitos de rega (Anon. 2008a).

B) Constituição da Empresa Municipal Porto Santo Verde, Resíduos Sólidos e Limpeza, E.M. que nasceu de uma estratégia conjunta entre a Câmara Municipal de Porto Santo e a Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo. Recentemente a sua designação social foi alterada para Porto Santo Verde, Geoturismo e Gestão Ambiental, Entidade Empresarial Municipal (E.E.M). Vocacionada para a gestão de resíduos, a Porto Santo Verde, E.E.M. desenvolve um serviço público de carácter estrutural, essencial ao bem-estar geral, à saúde pública e à protecção do ambiente, desde Fevereiro de 2001 (<http://www.portosantoverde.pt/>). Tendo um papel fundamental no desenvolvimento de actividades de interesse público na área do ambiente, a implementação da recolha selectiva de resíduos em Porto Santo foi uma das principais acções desenvolvidas desde Junho de 2001. Desde esta data que são enviados para reciclagem o vidro, o papel/cartão e as pilhas produzidos na Ilha. A Porto Santo Verde, E.E.M. é ainda responsável pela limpeza urbana, limpeza de praias, manutenção de jardins públicos,

informação e sensibilização ambiental e ainda manutenção do estatuto da Bandeira Azul da Europa para as Praias. Ainda, no âmbito da actividade da Porto Santo Verde, E.E.M., foi criada a primeira Ecoteca da RAM, inaugurada a 22 de Março de 2008.

C) Abertura do Centro de Processamento de Resíduos Sólidos de Porto Santo (CPRSPS), em Agosto de 2006, da responsabilidade da Empresa Valor Ambiente, Gestão e Administração de Resíduos da Madeira, S.A. (responsável pela gestão do sistema de transferência, triagem, tratamento e valorização dos resíduos da RAM). Esta foi uma medida de fulcral importância para a Ilha, pois com o CPRSPS foi possível o encerramento do aterro sanitário existente, uma vez que todos os resíduos (inclusive os domésticos) são agora acondicionados e enviados para ecocentros na Ilha da Madeira ou directamente para o Continente. Foi assim também, possível a introdução de embalões nos ecopontos possibilitando desta forma a recolha selectiva de embalagens e metais.

D) Construção de acessos à praia através de passadiços de madeira da responsabilidade da Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo. Esta foi uma das medidas de salvaguarda da praia de Porto Santo com o principal objectivo de minimizar a erosão e proteger o cordão dunar e recuperar zonas degradadas.

E) Melhoramento de veredas para percursos pedestres da responsabilidade da Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais no âmbito de um projecto INTERREG III B. Os percursos existentes permitem aos seus utilizadores desfrutar de paisagens de rara beleza e proporcionam o contacto com vários aspectos muito importantes da geologia, da flora e da fauna de Porto Santo.

F) Realização de acções que beneficiam de comparticipação comunitária através do Programa LIFE no âmbito do projecto “Conservação de Espécies Vegetais Prioritárias e Raras da Madeira” da responsabilidade da DRF, cujo objectivo consiste na recuperação de habitats naturais do Pico Branco na Ilha, designadamente: inventariação das espécies seleccionadas, diversas medidas de conservação das mesmas espécies vegetais, continuação dos trabalhos de ampliação e construção da casa e viveiros da Terra Chã, acções de sensibilização, visitas de estudo e distribuição de material informativo junto da comunidade madeirense e porto-santense.

G) Criação da Rede de Áreas Marinhas Protegidas de Porto Santo, através do Decreto legislativo Regional n.º 32/2008/M, de 13 de Agosto. A rede de áreas marinhas protegidas é constituída por uma parte terrestre que engloba todos os ilhéus circundantes da Ilha, e por uma parte marinha, correspondente à área circundante do Ilhéu da Cal ou de Baixo e do Ilhéu de Cima (incluindo a zona onde se encontra afundado o Navio “O Madeirense”). Os seus principais objectivos são o de proteger os recursos marinhos locais e a biodiversidade e, simultaneamente, promover a utilização sustentada do

espaço, criando condições para a realização de actividades de lazer geradoras de riqueza e emprego, com especial realce para o mergulho amador.

H) Candidatura de Porto Santo a Geoparque à rede europeia de Geoparques que se encontra sob a chancela da UNESCO, projecto da responsabilidade da Porto Santo Verde, Geoturismo e Gestão Ambiental, E.E.M.. Está prevista a entrega do dossier de candidatura do Geoparque de Porto Santo em Junho de 2009. Este projecto, que visa o desenvolvimento sustentável da Ilha de Porto Santo, tem como objectivo dar a conhecer e conservar o rico património geológico existente na Ilha; promover e valorizar este património junto das populações locais e do grande público; sensibilizar a população escolar para a importância do património geológico no âmbito da conservação da natureza; promover um turismo sustentável de qualidade, suportado pelos valores naturais e culturais da Ilha, englobando as múltiplas actividades turísticas em curso; potenciar o desenvolvimento de actividades económicas tradicionais relacionadas com o património histórico e cultural e divulgar exemplos de boas práticas de cooperação entre as actividades comerciais e industriais e o conhecimento científico.

I.2 Projecto REI

Pelo exposto nas secções anteriores, e considerando as características únicas da Ilha de Porto Santo, a Universidade de Aveiro, em colaboração com a DRF, iniciou há quase uma década estudos de avaliação fisiológica de plantas de *Olea maderensis* que ainda crescem em Porto Santo, associando a avaliação com dados das condições climáticas e “status” do solo. Estes dados têm permitido avaliar alguns parâmetros destas plantas no campo, nomeadamente, o “status” nutricional e o stress hídrico, e assim fornecer informação para trabalhos de propagação destes indivíduos em laboratório, dado que a sua propagação in situ tem sido limitada ou inexistente (Brito 2000, Brito et al. 2003; Santos et al. 2003).

Na sequência destes estudos, foi desenvolvido recentemente o Projecto REI – “Reflorestação da Ilha de Porto Santo usando plantas autóctones regeneradas in vitro e adaptadas a stress hídrico” (Ref. PNAT/1999/AGR/15011/99, duração entre 2000-2005), envolvendo a Universidade de Aveiro e diversas entidades da RAM, nomeadamente a DRF, a Câmara Municipal de Porto Santo e a Empresa Porto Santo Verde, E. E.M. (Brito et al. 2007b).

O Projecto REI teve como objectivo inicial utilizar recursos de biotecnologia, como a cultura *in vitro*, tendo em vista a propagação e consequentemente a protecção de alguns taxa de lenhosas indígenas ameaçadas, bem como a preservação do germoplasma destas espécies e, deste modo, contribuir para o processo de reflorestação da Ilha de Porto Santo. Assim, a produção de exemplares e a sua reintrodução em áreas protegidas e jardins permitirá, a médio prazo, contribuir para a conservação das populações insulares e da sua diversidade genética (Brito et al. 2007b). Contudo, dadas as características únicas desta Ilha, a importância e premência da sua preservação, e a excelente colaboração estabelecida entre as entidades envolvidas no projecto REI, a ideia inicial foi alargada para um trabalho de levantamento de fundo das características de algumas vertentes do ecossistema da Ilha, que em alguns aspectos permaneciam e/ou permanecem ainda por descobrir. Neste sentido, procedeu-se a uma caracterização dos ecossistemas da Ilha, com o intuito de conhecer as condições de adaptação das plantas micropropagadas à Ilha de Porto Santo (Brito et al. 2007ab; Moreira et al. 2007, Luís e Leão 2007, Antunes et al. 2008).

Para a consecução deste projecto contribuiu uma equipa pluridisciplinar de investigadores que desenvolveram estudos em diversas áreas entre as quais se destacam: 1) caracterização físico-química e microbiana dos solos e águas de alguns pontos da Ilha; 2) identificação dos macroinvertebrados do solo; 3) identificação das algas de água doce; 4) identificação de aves; 5) identificação do coberto vegetal existente em algumas zonas da Ilha; 6) acompanhamento das plantas micropropagadas e continuação dos estudos de micropropagação (Brito et al. 2007b). Os locais de amostragem para cada uma das áreas em estudo constam da Figura I.10.

Os resultados mais relevantes do Projecto REI apontam para a existência de solos pobres em matéria orgânica devido ao reduzido coberto vegetal, e uma diversidade microbiana bastante abaixo dos valores normais para um solo fértil (Moreira et al. 2007). As zonas florestadas revelaram maior diversidade de macroinvertebrados de solo (indicador de uma maior estabilidade do ecossistema) (Antunes et al. 2008) e de avifauna (encontradas duas espécies nidificantes, cuja nidificação ainda não havia sido referenciada) (Luís e Leão 2007). Ainda no âmbito deste projecto foram desenvolvidos estudos de inventariação da flora que permitiram constatar uma grande pobreza no estrato arbóreo, confirmando-se que a vegetação ali existente é sobretudo herbácea, onde existe o maior número de endemismos. É pertinente alertar para a necessidade de, em trabalhos de florestação futuros, dar importância à manutenção da biodiversidade, bem como à conservação de habitats de espécies (Brito et al. 2007ab). Estes resultados

foram ainda alvo de uma transposição para SIG, numa abordagem pioneira para a Ilha (ver Brito et al. 2007a).

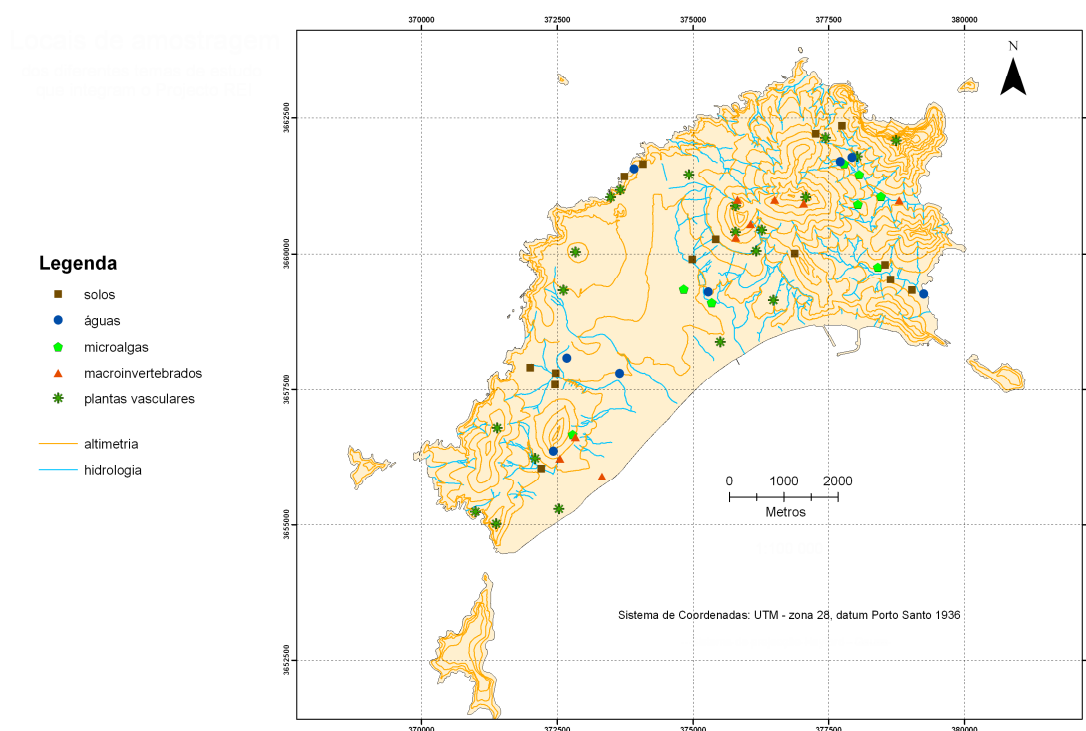


Figura I.10 – Locais de amostragem dos diferentes temas que integraram o Projecto REI (Brito et al. 2007b)

Paralelamente aos estudos de caracterização dos ecossistemas da Ilha, utilizaram-se recursos de biotecnologia vegetal, para propagar taxa autóctones (e.g. *Olea maderensis* e *Juniperus phoenicea*) contribuindo para estratégias de preservação do germoplasma destas espécies (Brito et al. 2007c, Loureiro et al. 2007).

O desenvolvimento de actividades de Educação Ambiental na Ilha vem sendo, desde há algum tempo, uma preocupação por parte das entidades locais. Deste modo, uma outra vertente do Projecto REI foi associar-se a actividades de Educação Ambiental, a decorrerem na Ilha, por forma a contribuir para uma maior consciencialização da população (abrangendo as várias faixas etárias) para os problemas ambientais que mais afectam a Ilha de Porto Santo, fornecendo deste modo indicadores, para a formação como cidadãos conscientes da riqueza única e inestimável que é a Ilha de Porto Santo.

Assim, algumas das actividades desenvolvidas com a colaboração das diversas entidades envolvidas no Projecto REI, foram: a) abordagem a temas do projecto REI no âmbito de aulas de educação ambiental junto das Escolas do 1º Ciclo do Ensino Básico promovidas pela Autarquia de Porto Santo e pela Porto Santo Verde, E.E.M.; b) acções

de educação ambiental no âmbito da Bandeira Azul da Europa (conferências, jogos educativos na praia, programa de rádio, etc.) promovidas pela Autarquia do Porto Santo e a Porto Santo Verde, E.E.M.; c) “Simpósio de Biodiversidade em ecossistemas insulares: o exemplo de Porto Santo”⁴, promovido pela Universidade de Aveiro, DRF e Porto Santo Verde, E.E.M.; d) Acção de Formação Pedagógica vocacionada para professores do ensino básico e secundário, validada pela Secretaria Regional de Educação da RAM, promovida pela Universidade de Aveiro, DRF e Porto Santo Verde, E.E.M. A acção intitulou-se “Ensinar Ciências para a Compreensão numa Perspectiva Investigativa: a Ilha de Porto Santo como objecto de estudo”⁵.

I.3. Objectivos Gerais da Dissertação

Considerando alguns dos esforços de recuperação do coberto vegetal desenvolvidos na Ilha e o conhecimento entretanto adquirido no âmbito do projecto REI (e.g. caracterização de ecossistemas da Ilha e ensaios de propagação de espécies autóctones), estabeleceram-se, para esta dissertação, objectivos científicos assentes em abordagens complementares de ciências biológicas e sociais.

Neste contexto, definiram-se os objectivos gerais desta dissertação:

- Preservação de germoplasma e (re)introdução na Ilha de uma espécie endémica e em risco do Arquipélago da Madeira (*Olea maderensis*) e de uma espécie introduzida (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*), recorrendo para o efeito a técnicas de biotecnologia vegetal (micropropagação) para a propagação em larga escala.
- Avaliação da percepção da comunidade relativamente ao fenómeno da desertificação e implementação de medidas mitigadoras onde se inclui o recurso a estratégias alternativas, de valorização do coberto vegetal, envolvendo a biotecnologia (micropropagação) para a minimização dos processos de desertificação em curso.

⁴ O Simpósio pretendeu fazer a divulgação junto da população e também das entidades locais, dos primeiros resultados obtidos no âmbito do Projecto REI, bem como dar a conhecer os trabalhos actualmente desenvolvidos na Ilha por parte da DRF e aspectos da sua biodiversidade.

⁵ A Acção de Formação Pedagógica pretendeu sobretudo desenvolver competências disciplinares e didácticas necessárias à implementação de actividades práticas (experimentais, laboratoriais e de campo), numa perspectiva investigativa.

I.3.1 Estratégias de investigação adoptadas

De modo a atingir os objectivos propostos, foram definidas estratégias para o desenvolvimento das metodologias de investigação para a valorização do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo, nomeadamente:

a) Aplicação de técnicas de biotecnologia para a propagação em larga escala e preservação de duas espécies de *Olea*

No desenvolvimento desta metodologia, recorreu-se a técnicas de biotecnologia vegetal (cultura in vitro) para a propagação em larga escala de duas espécies de *Olea*, uma espécie nativa e endémica do Arquipélago da Madeira (*Olea maderensis*) e uma espécie introduzida (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*). Após o desenvolvimento e optimização dos protocolos de micropropagação destas espécies, prevê-se a sua utilização em programas de reflorestação da Ilha, preferencialmente da *Olea maderensis*. A *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* é uma espécie característica dos ecossistemas naturais do Mediterrâneo e foi introduzida na Ilha de Porto Santo, juntamente com outras espécies arbóreas, na década de 50 do século XX, para combate aos processos erosivos (Andrada 1990), estando actualmente adaptada às condições edafo-climáticas da Ilha. A *Olea maderensis* é uma espécie nativa e endémica, sendo deste modo, a espécie eleita para integração nos programas de reflorestação da Ilha. A escolha desta espécie, como modelo de estudo no âmbito desta dissertação, foi feita, considerando que:

- a vegetação florestal original de Porto Santo seria dominada a altitudes inferiores (0-200 m), pelo Zambujal (comunidade florestal dominada pela *Olea maderensis*), detectado por análises da corologia e da dinâmica vegetacional (Capelo et al. 2007);
- actualmente, esta espécie é diagnosticada como espécie sensível, pois ocorrem apenas alguns exemplares isolados e em número muito reduzido (o Zambujal corresponde ao habitat 9320 “Florestas de *Olea* e *Ceratonia*” da Directiva Habitats) (Sequeira et al. 2007);
- é uma espécie privilegiada a ser utilizada em programas de reflorestação da Ilha, como alternativa às coníferas, por adaptar-se bem às condições climáticas (resiste bem a altas temperaturas e à seca) e apresentar uma boa propensão para o combate aos processos erosivos (consegue crescer em solos pobres e declives rochosos) (Tous and Ferguson 1996, Vieira 2004 com. pessoal).

b) A percepção das comunidades locais relativamente à valorização do coberto vegetal para minimização dos processos de desertificação

Considerando alguns aspectos presentes na Ilha de Porto Santo, nomeadamente, apresentar características de uma região semi-árida, níveis de precipitação baixos, ter sofrido desertificação/degradação dos solos ao longo do tempo e devastação do seu coberto vegetal e ainda a ocorrência de processos erosivos, foi definida uma estratégia que pretendeu analisar a percepção da comunidade local e visitante (residentes, visitantes e entidades/especialistas) sobre o fenómeno da desertificação e o estado actual do coberto vegetal na Ilha, bem como, o seu grau de conhecimento e aceitação relativamente à aplicação de novas metodologias, nomeadamente a micropropagação de plantas nativas, para introdução em programas de florestação em curso, como medida mitigadora do processo de desertificação.

Para o efeito recorreu-se à recolha de informação através da aplicação de inquéritos por questionário e ainda a realização de inquéritos por entrevista.

1.4 Estrutura da Dissertação

A dissertação está organizada em quatro partes principais. Nesta parte (Parte I), é apresentado o âmbito da investigação, pelo que se inicia com a caracterização da área de estudo (Ilha de Porto Santo), fazendo-se de seguida o enquadramento do problema ambiental da Ilha relativamente à degradação dos solos/desertificação com base na caracterização/evolução do coberto vegetal ao longo dos anos. São também definidos os objectivos gerais, a estratégia de investigação adoptada e a estrutura que segue a presente dissertação.

As Partes II e III apresentam as duas metodologias de investigação desenvolvidas no âmbito desta dissertação.

A Parte II descreve o desenvolvimento das metodologias no âmbito da biotecnologia vegetal para propagação rotineira de espécies de *O. maderensis* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*. Esta parte está dividida em seis capítulos. O Capítulo II.1 faz uma breve introdução aos aspectos mais importantes da micropropagação de oliveira (*O. europaea* L.), principalmente através da micropropagação por estimulação de gomos axilares e apresenta os objectivos específicos desta investigação. Os capítulos II.2 a II.5, referem-se aos estudos desenvolvidos no âmbito da biotecnologia, nomeadamente: II.2)

caracterização genética de genótipos de *O. maderensis* do Arquipélago da Madeira; II.3) optimização das condições de cultura in vitro (e.g. desinfeção e meio de cultura) para propagar e preservar *O. maderensis*; II.4) definição de dois protocolos de micropropagação e aclimatização das duas espécies em estudo e avaliação da qualidade das plantas (“true-to-type”) por citometria de fluxo (FCM) e marcadores moleculares (SSRs); e II.5) definição, para *O. maderensis*, de um protocolo eficiente de aclimatização a campo e avaliação da “performance” das plantas micropropagadas no campo através da análise de parâmetros fisiológicos durante o processo. Estes capítulos foram já alvo de publicação/submissão em revistas internacionais. Finalmente o Capítulo II.6 apresenta os estudos em curso relativamente às plantas de *O. maderensis* em aclimatização no campo, bem como a introdução de plantas micropropagadas num outro local da Ilha com um maior grau de degradação dos solos. Salienta ainda a necessidade de estudos semelhantes com outras espécies nativas.

Na Parte III, descreve-se a metodologia desenvolvida para a avaliação da percepção da comunidade relativamente à valorização do coberto vegetal para a minimização dos processos de degradação dos solos/desertificação. Nesta parte é feito o enquadramento teórico sobre o fenómeno da desertificação, particularmente na Ilha de Porto Santo e sobre a percepção social da desertificação. São também definidos os objectivos específicos desta investigação. Apresentam-se e discutem-se, os resultados obtidos no âmbito da consulta à população e entidades/especialistas, e finalmente são apresentadas as conclusões e algumas recomendações.

A Parte IV apresenta as conclusões gerais desta dissertação, respondendo aos objectivos propostos e são abordadas algumas perspectivas futuras.

Referências

- Andrada E.C. (1990). Repovoamento florestal no Arquipélago da Madeira (1952-1975). Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Lisboa.
- Anon. (1999a). Dados Climatológicos da Ilha de Porto Santo (1961–1990). Observatório Meteorológico, Delegação Regional da Madeira.
- Anon. (1999b). Plano Director Municipal do Porto Santo. Câmara Municipal do Porto Santo, Secretaria Regional do Equipamento Social e Ambiente, Região Autónoma da Madeira.
- Anon. (2000). Plano Regional da Política de Ambiente – Caracterização de base. Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais, Região Autónoma da Madeira.
- Anon. (2006). Estatísticas do Trabalho – Quadros de Pessoal 2006. Direcção de Serviços de Estatísticas do Trabalho da Direcção Regional do Trabalho/GEP – Gabinete de Estratégia e Planeamento. Região Autónoma da Madeira, Maio. Acedido em 11 de Dezembro de 2008 em: <http://www.srrh-recursoshumanos.pt/drt.html>.
- Anon. (2008a). Programa Operacional Plurifundos da Região Autónoma da Madeira 2000-2006 (POPRAM). Instituto de Desenvolvimento Regional, Secretaria Regional do Plano e Finanças, Governo Regional da Madeira. Acedido em 11 de Dezembro de 2008 em: <http://www.idr.gov-madeira.pt/pt/popram.asp>.
- Anon. (2008b). Estatísticas Demográficas da Região Autónoma da Madeira 2006. Direcção Regional de Estatística da Madeira. ISSN 1645-6769. Acedido em 11 de Dezembro de 2008 em: <http://estatistica.gov-madeira.pt/>.
- Antunes S.C., Pereira R., Sousa J.P., Santos C., Gonçalves F. (2008). Spatial and temporal distribution of litter arthropods in different vegetation covers of Porto Santo Island (Madeira Archipelago, Portugal). *European Journal of Soil Biology* 44 (1): 45-56. doi:10.1016/j.ejsobi.2007.08.016.
- Brito G. (2000). Micropropagação de duas espécies autóctones da Ilha de Porto Santo (*Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe e *Juniperus phoenicea* L.) e estudo da resposta de rebentos *in vitro* a stress osmótico (Dissertação de Mestrado em Ciências das Zonas Costeiras), Universidade de Aveiro.
- Brito G., Brito L., Costa E., Salgueiro M., Pinho R., Leão F., Santos C. (2007a). Aplicação SIG na elaboração de cartografia temática do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo. *Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural)* Sup. Nº 12: 61-83. ISSN 0870-3876.

- Brito G., Gonçalves F. and Santos C. (2007b). Contributo do Projecto REI na avaliação dos ecossistemas de Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 5-26. ISSN 0870-3876.
- Brito G., Jardim R., Coelho C., Santos C. (2007c). Micropropagação de uma espécie autóctone de Porto Santo como estratégia de combate à desertificação: exemplo da oliveira brava. Silva Lusitana 15 (2): 229-247.
- Brito, G., Costa, A., Fonseca, H., and Santos, C. (2003). Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* in vitro shoots to osmotic stress. Scientia Horticulturae 97: 411-417.
- Capelo J., Sequeira M., Jardim R., Mesquita S. (2007). Biologia e ecologia das florestas das Ilhas – Madeira. In: Árvores e Florestas de Portugal – Açores e Madeira, a floresta das Ilhas. Silva J.S. (ed.), Vol 6. Público, Comunicação Social, S.A., Lisboa, Portugal, pp. 81-135.
- Costa C.J., Capelo J., Jardim R., Sequeira M. (2004). Catálogo Florístico do Arquipélago da Madeira. In: Quercetea. Lousã M.F., Espírito Santo M.D., Capelo J.H. (eds.), vol. 6. ALFA, Lisboa, Portugal, pp. 187-200.
- DREM (2008). Indicadores demográficos – Demografia Porto Santo (ofício com Ref. Nº.: 362/DRE de 25-11-2008). Direcção Regional de Estatística da Madeira, Secretaria Regional do Plano e Finanças, Governo Regional da Madeira.
- Filipe M.A. (2007). Contributo da floresta na biodiversidade do Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 27-32. ISSN 0870-3876.
- Franco E.P.C. (1994). Carta dos Solos da Ilha do Porto Santo. Centro de Estudos de Pedologia (Instituto de Investigação Científica Tropical) (ed.) D.R.A., Lisboa.
- INE (2001). Censos 2001, XIV Recenseamento Geral da População, IV Recenseamento Geral da Habitação, Resultados Definitivos Madeira. Instituto Nacional de Estatística, Portugal.
- Jardim R., Fontinha S., Fernandes F. (1998). Pico Branco: A Peculiar Floristic Site on Porto Santo Island. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) 50(285): 43-57.
- Loureiro J., Capelo A., Brito G., Rodriguez E., Silva S., Pinto G., Santos C. (2007). Micropropagation of *Juniperus phoenicea* L. adult plants and ploidy stability analyses in micropropagated plants using flow cytometry. Biologia Plantarum 51 (1): 7-14.
- Luís A., Leão F. (2007). Estudo da riqueza avifaunística da Ilha de Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 53-60. ISSN 0870-3876.

- Moreira H., Santos C., Mendo S. (2007). Estudos microbiológicos preliminares de amostras de solo da Ilha de Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 43-52. ISSN 0870-3876.
- Pereira E.C.N. (1989). Ilhas de Zargo. Vol. I, 4ª edição, Funchal.
- Quintal R. (2001). Levadas e Veredas da Madeira. Ribeiro F. (ed.). Madeira
- Santos C., Brito G., Pinto G., Fonseca H. (2003). In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *madeirensis*. Scientia Horticulturae 97: 83-87.
- Rivas-Martínez S., Wildpret W., Paz P.L.P (1993). Datos sobre *Juniperus phoenicea* aggr. (Cupressaceae). Itinera Geobotanica 7: 509-512.
- Sequeira M., Jardim R., Capelo J. (2007). A chegada dos portugueses às Ilhas – o antes e o depois – Madeira. In: Árvores e Florestas de Portugal – Açores e Madeira, a floresta das Ilhas. Silva J.S. (ed.), Vol 6. Público, Comunicação Social, S.A., Lisboa, Portugal, pp. 165- 196.
- Silva J.B. (2003). Areia de praia da Ilha do Porto Santo, geologia, génese, dinâmica e propriedades do seu interesse medicinal. Madeira Rochas – Divulgações Científicas e Culturais (ed.). Madeira.
- Silva F.N., Saraiva M.G., Ramos I.L., Gomes M.C., Gonçalves V., Monteiro, F. (2004). Desertificação em Portugal: Incidência no Ordenamento do Território e no Desenvolvimento Urbano. Vol I. Direcção Geral do Ordenamento do Território e Desenvolvimento Urbano (ed.). Campo Grande, Lisboa.
- Søndergaard P. (1996). Introduction of exotic woody species in a degraded island ecosystem (Porto Santo in the Madeiran Archipelago). Bocconeia 5: 409-416
- Tous J., Ferguson L. (1996). Mediterranean fruits. In: Progress in new crops. Janick J. (ed.). ASHS Press, Arlington, VA, pp. 416-430.

PARTE II

Plant biotechnology applications for propagation and preservation of two wild olive species (*Olea maderensis* and *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*)

Aplicação de técnicas de biotecnologia vegetal para a propagação e preservação de duas espécies de oliveira brava (*Olea maderensis* e *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*)

Capítulo II.1

Introduction

Introdução

II.1 Introduction

II.1.1 Botany and geographical distribution of *Olea europaea*

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a highly important and worldwide distributed fruit crop that possesses the largest geographic distribution within this genus (Figure II.1.1). The species, originating in the eastern part of the Mediterranean Basin, belongs to the *Oleaceae* family and comprises about 30 genera including various garden and economical plants (Rugini and Lambardi 2003). The basic haploid chromosome number of the genus *Olea* is 23 ($2n=2x=46$). Other than in the Mediterranean countries, subspecies are also found in Western Africa, Tanzania, South Africa, Arabian Peninsula, Central Asia, and the Canary and Madeira Islands (Rugini 1995).

Green (2002) described six subspecies of *Olea europaea*:

- a) **ssp. *europaea*** is a distinctive element of the Mediterranean Basin flora and serves to characterise both natural (var. *sylvestris* Brot.) and agricultural (var. *europaea*) ecosystems;
- b) **ssp. *guanchica*** P. Vargas, J. Hess, Muñoz Garm. and Kadereit occurs in Canary Islands. Rivas-Martinez et al. (2002), found enough evidences for creating a new combination taxon name, with *O. europaea* ssp. *guanchica* being elevated to ***Olea cerasiformis* Rivas Mart. & Del Arco**;
- c) **ssp. *cerasiformis*** Webb and Berth. ex Kunkel and Sunding [previously named by Vieira (1992) as *Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe] is native from the Madeira Archipelago. Rivas-Martinez et al. (2002), found enough evidences for creating a new combination taxon name, with *O. europaea* ssp. *cerasiformis* being elevated to ***Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco**. Until further clarification by the scientific community, this most updated taxonomical nomenclature (*Olea maderensis*) has been chosen and followed throughout this Dissertation (see Chapter II.2).
- d) **ssp. *maroccana*** (Greut. & Burd.) P. Vargas, J. Hess, Muñoz Garm. and Kadereit occurs in the South-West Morocco;
- e) **ssp. *laperrinei*** (Batt. & Trab.) Cif. can be found in Agadir, Jebel Marra and Hoggar Mountains;
- f) **ssp. *cuspidata*** (Wall. ex G. Don) Cif., which is widely distributed in South and East Africa, Arabian Peninsula and Central Asia.

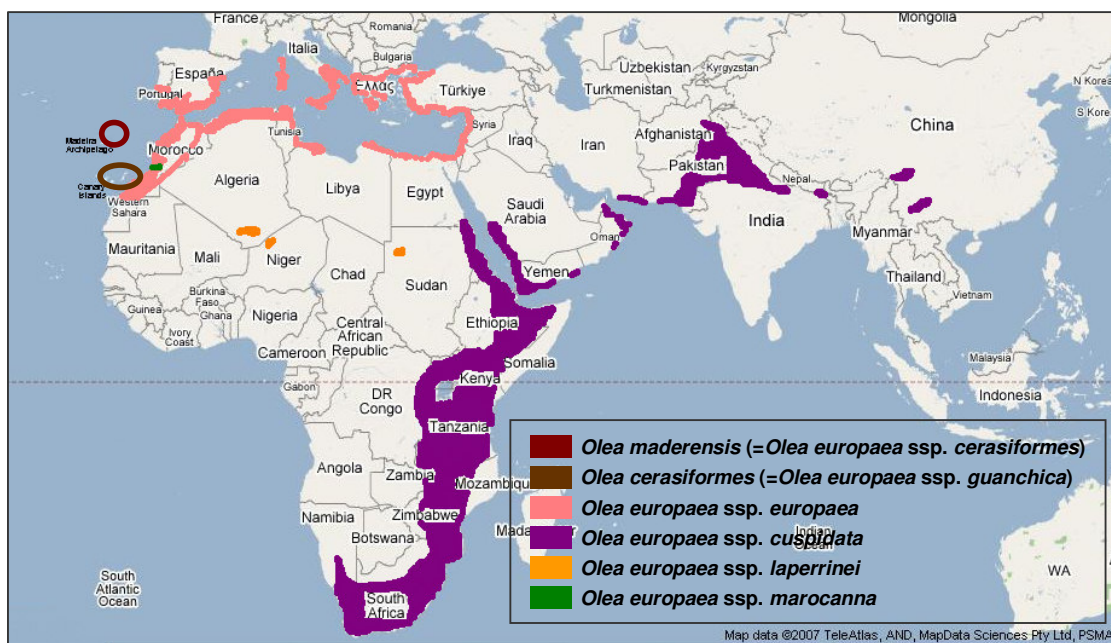


Figure II.1.1 - Geographical distribution of the six currently recognised subspecies of *Olea europaea* L. (adapted from Casas et al. 2006; map adapted from <http://www.glosk.com>).

II.1.2 Distribution and ecology of *Olea maderensis*

Madeira Archipelago and Canary Islands form two groups of volcanic islands and rock islets found in the Macaronesian region (Figure I.1). In this region the originality of its flora and ecosystems is conditioned by its geographical position and therefore, in these Islands exists original and endemic vegetation as it is the case of the native wild olives trees (Capelo et al. 2004).

In the Madeira Archipelago the wild olive (*Olea maderensis*) is an endemic and endangered tree, the remnants of which, particularly small stands or single-tree stands, occur in rocky mountain slopes (Figure II.1.2). In Madeira Island *O. maderensis* is a particularly important component of an arboreal climatic community (micro-forest) named Zambujal that occurs in dry infra-mediterranean climate, in poor soils, exclusively at low altitudes (0-200 m), on the declivous ravines of the coast (Capelo et al. 2007).



Figure II.1.2 - *Olea maderensis* populations located in inaccessible sites of Madeira Archipelago. A – Isolated wild olives (white arrows) in a rocky slope of Madeira Island (Cabo-Girão); B – Isolated wild olives (red circle) in the top of a mountain in Port Santo Island (Pico de Ana Ferreira); C – Isolated wild olive in a rocky slope of Madeira Island (Ribeira Brava).

In Porto Santo Island, a serious process of desertification is occurring since a long time, with only a few isolated individuals of *O. maderensis* being found in almost inaccessible rifts/mountains, where they survive under adverse environmental conditions (Figure II.1.3) (Sequeira et al. 2007). Owing to this problems, it is very important to contribute for the valuation of the vegetal areas of Port Santo Island, through the definition of strategies involving the preservation and propagation techniques (e.g. micropropagation) of native species at risk, as it is the case of *O. maderensis* (Brito et al., 2007). Propagation through seed of this species is hindered due to poor germination and to the difficulty in obtains seeds, and conventional method of propagation is rather slow. To overcome these problems, tissue culture techniques offer a viable tool for mass propagation and multiplication in variety of plant species (Ahmad and Anis 2007).

Micropropagation of woody plants is particularly advantageous when integrated with strategies to combat desertification and protect native species as far as it allows both preservation of germplasm in danger and large scale multiplication of plants.

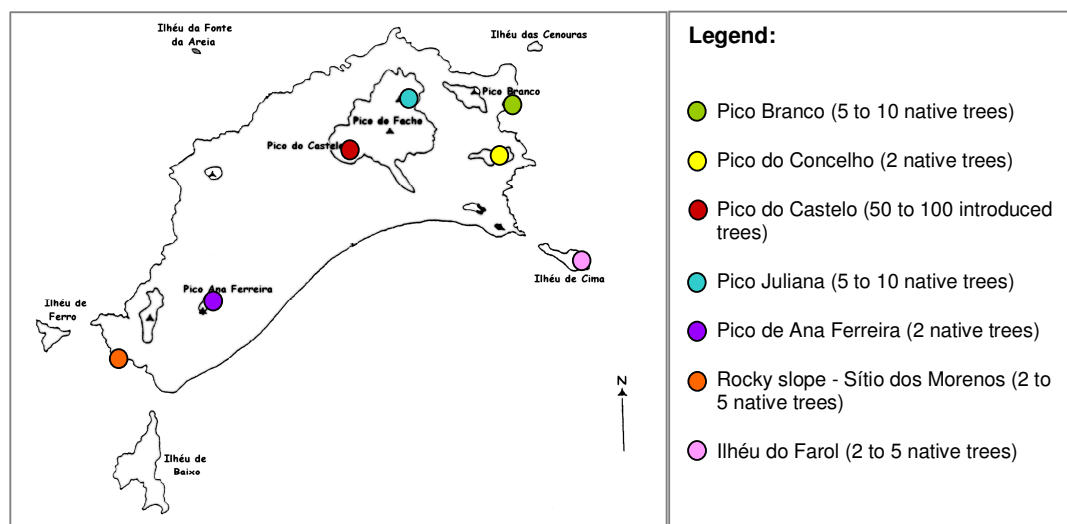


Figure II.1.3 – Distribution of native (*Olea maderensis*) and introduced (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) wild olives in Porto Santo Island (Jardim 2006 personal com.).

II.1.3 Micropropagation techniques

Micropropagation has become a reliable and routine approach for large-scale rapid plant multiplication, which is based on plant cell, tissue and organ culture on well defined tissue culture media under aseptic conditions (Jain and Häggman 2007). The greatest use of tissue culture plants has been in fruit trees for the production of clonal rootstocks. In forestry there is agreement concerning the principle, but costs are a serious handicap for practical acceptance (Debergh 1988).

A lot of research efforts have been made to develop and refine micropropagation methods and culture media for large-scale plant multiplication of several number of plant species. However, many forest and fruit tree species still remain recalcitrant to in vitro culture and require highly specific culture conditions for plant growth and development (Jain and Häggman 2007). For large-scale in vitro plant production the important attributes are the quality, cost effectiveness, maintenance of genetic fidelity, and long-term storage. The need for appropriate in vitro plant regeneration methods for woody plants, including both forest and fruit trees, is still overwhelming in order to overcome problems facing micropropagation such as somaclonal variation, recalcitrant rooting, hyperhydricity, polyphenols, loss of material during hardening and quality of plant material. Moreover, micropropagation may be utilized, in basic research: (i) in production of pathogen-free plant material in a short time; (ii) in propagation of cultivars difficult to obtain through own-rooted cutting; (iii) cryopreservation of endangered and elite woody species; (iv)

applications in tree breeding and reforestation; (v) the possibility of scheduling plantlet production closer to the market demand (Premakur et al. 2001; Briccoli Bati et al. 2006).

The main factors to be considered when microculturing a plant tissue can be grouped into five broad categories: a) tissue (e.g. genotype, donor tissue and phytosanitary status); b) media (minerals, growth regulators and other organics, supporting agents); c) environment (light, temperature, gases, vessels); d) timing (subculture period, dosage); e) interactions between the above factors (Debergh 1988).

Cultures are generally initiated from sterile pieces of a whole plant. These pieces are termed “explants”, and may consist of pieces of organs, such as leaves, roots, petioles, stems or meristems, or may be specific cell types, such as pollen or endosperm. Many features of the explant are known to affect the efficiency of culture initiation. Generally, younger, more rapidly growing tissue (or tissue at an early stage of development) is most effective. Figure II.1.4 demonstrates the main micropropagation strategies and pathways of plant explants development. The methods that are theoretically available for the propagation of plants are essentially: i) by the multiplication of shoots from axillary buds; and ii) by the formation of adventitious shoots, and/or adventitious somatic embryos, either a) directly on pieces of tissue from the donor plant; or b) indirectly from unorganised cells (in suspension cultures) or tissues (in callus cultures) established by the proliferation of cells within explants (George and Debergh 2007).

II.1.4 Tissue culture techniques in Olive

Olea europaea is mainly propagated by cuttings and budding or grafting onto rootstocks. Seed propagation is restricted only for rootstock propagation and for breeding. However, there are several limitations in traditional propagation methods of *O. europaea*. Seed germination is reduced by the endocarp, which prevents imbibition and oxygen diffusion (Hatzopoulos et al. 2002).

As an alternative, tissue culture techniques could provide adequate initial plant material. The first known scientific reports on in vitro olive propagation are from the mid 1970s, where researchers tried to optimize the mineral media formulations for all of the culture stages, in order to establish a micropropagation protocol that would suit all cultivars (Peixe et al. 2007). Thus, a new medium (OM medium) was developed by Rugini (1984) which gave a considerable progress on olive micropropagation all over the world. Proliferation medium (OM) was formulated on the basis of an analysis of the main mineral elements found in shoot apices of vigorous field-grown plants and in matures zygotic embryos (Rugini 1984).

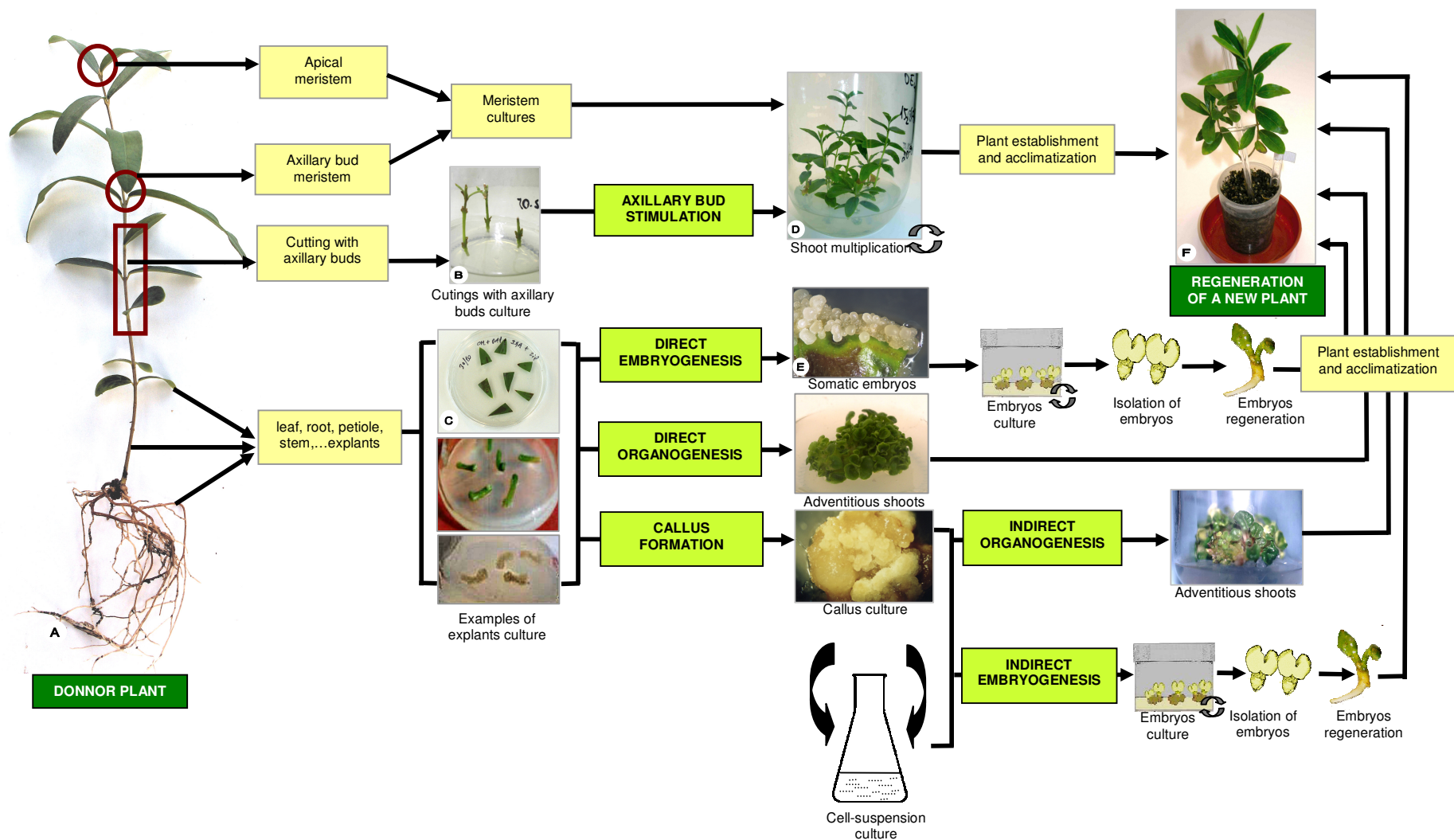


Figure II.1.4 – Main micropropagation strategies and pathways of plant explants development. Photos A to F are examples on *Olea* sp. (adapted from George and Debergh 2007).

According to Rugini and Baldoni (2005), OM medium is rich in Ca, Mg, S, P, B, Cu and Zn, with an altered Ca/N ratio (1:11), and contains glutamine as a reduced nitrogen source. The Ca/N ratio is an important factor in olive micropropagation, as it can affect maintenance of healthy shoots.

Some adaptations of the original MS medium (Murashige and Skoog 1962), for example the MSI modified by Fiorino and Leva (1986) and the MSM, modified by Leva et al. (1992) and, mostly the OM medium, are considered up-to-now as the most suitable ones for olive micropropagation, but they also proved not to be effective for all cultivars (Peixe et al. 2007).

During the last decades, extensive work has been done using in vitro techniques in olive, aiming at a rapid “true-to-type” propagation, the production of disease-free plants, the cryopreservation of elite germplasm, and genetic improvement. Isolated embryos cultured in vitro on suitable solid culture medium could develop into normal plantlets. In vitro regeneration has been demonstrated (Rugini 1988). However, there are still some difficulties due to low efficiency of regeneration. Nevertheless, the current progress on olive tissue culture is very promising for future utilization of in vitro techniques for large-scale propagation and for breeding purposes (Hatzopoulos et al. 2002).

In olive (*Olea europaea*), it is possible to produce plants from both zygotic and mature tissues from different cultivars under the three micropropagation techniques: a) by axillary buds stimulation (see Table II.1.1 – literature revision of the last decades investigation on this issue); b) by direct or indirect organogenesis (e.g. Canas and Benbadis 1988, Mencuccini and Rugini 1993); c) by somatic embryogenesis reported in different olive cultivars using mostly young donors such as cotyledonary tissues (Orinos and Mitrakos 1991, Leva et al. 1995, Trabelsi et al. 2003), immature zygotic embryos (Rugini 1988, Leva et al. 1995), mature zygotic embryos (Orinos and Mitrakos 1991, Mitrakos et al., 1992) and leaf blades, leaf petioles, hypocotyls of germinated seeds (Shibli et al. 2001).

In the work developed during this PhD, it was optimized a protocol based on micropropagation by axillary bud stimulation (Figure II.1.4) (see chapter II.3 and II.4). Protocols for in vitro propagation of olive cultivars, using this technique, were reported many years ago (Rugini 1984) and they are actually a commercial reality in the nursery production for several olive cultivars by using mature material (Rugini and Pesce 2006). This technique allows high quality production and rapid growth of the plants, which are pathogen free on the surface and in the vascular system. The rate of growth is superior to plants derived from stem cuttings, they produce flowers and behave in the same manner as plants derived from suckers or somatic embryos (Rugini and Pesce 2006). Rooting is obtained in high percentage, even in cultivars considered recalcitrant when propagated

from stem cuttings like 'Nebbiara' (Zacchini and De Agazio 2004). Shoots are rooted on medium supplemented with either indolebutyric acid (IBA) or α -naphthalene acetic acid (NAA) (Table II.1.1). Effective results were obtained when shoot cultures for rooting are incubated in darkness for 5-7 days, prior to transfer to light (Rugini and Baldoni 2005).

Micropropagated olive plantlets have thin cuticle, low stomatal density and single palisade (Cozza et al. 1997). Acclimatization under high relative humidity with continuous light is essential to obtain plants with good lateral branches, ready for transplanting. In field trials, micropropagated plants begin to flower at the same time as plants propagated by cuttings (Rugini and Baldoni 2005).

Also the genetic stability of plants propagated by this method is very reliable, with no genotypic and/or phenotypic variations observed in different cultivars (Rugini and Pesce 2006).

Nevertheless, Rugini (1995) points some problems that involved the use of these techniques: a) difficulties in obtaining sterile shoots; b) stimulation of axillary buds and subsequent shoot elongation require high concentrations of zeatin, which is relatively expensive and contributes to high production cost; c) shoots grow with a strong apical dominance (from one bud, only one shoot), Rugini and Baldoni (2005) suggested that lateral basal buds of the new shoots could be forced, when they are still attached to the explant, by decapitating the apex of each shoot at each subculture for several subcultures.

As described above, in the last decades significant progress has been made in developing in vitro techniques for cloning some olive (*O. europaea*) cultivars. However, little work has been made, on propagating other olive species/subspecies. Colella et al. (2008) micropropagate fifty-seven wild olive accessions collected from the Mediterranean Basin, using microcuttings from young vegetative shoots, to study their resistance to verticillium wilt. Pignatti and Crobeddu (2005) carried out tests on cutting propagation of seven Mediterranean shrub species including *Olea europaea* var. *sylvestris* to compare rooting percentage of cuttings from shoots of mature plants with those from rejuvenated plants. Also Marin-Zamora (2002) micropropagate the wild olive (*Olea europaea* var. *oleaster*) to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizae. Orinos and Mitrakos (1991) tried rhizogenesis and somatic embryogenesis using cotyledonary tissues and mature zygotic embryos from the wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr). Negash (2003) described a rapid vegetative propagation method for the threatened African wild olive [*Olea europaea* L. subsp. *cuspidata* (Wall. ex DC.) Cifrieri]. And finally Lopes et al. (2009) used nuclear microsatellite analyses to verify the genetic variability/stability of the somatic embryogenesis induction process in both *Olea europaea* and *Olea maderensis*.

Table II.1.1 – Summary of the literature revision (scientific papers published on international journals), on *Olea europaea* L. micropropagation, by axillary bud stimulation.

Article (Authors+Date)	Species and (or) cv./var.	Explant source	Proliferation Media	Plant growth regulators	Rooting Media	Plant Growth regulators
Binet et al. 2007	<i>Olea europaea</i> L. var. 'Aglandau' and var. 'Tanche'	Nodal segments with axillary buds	OM mod. – ½ of macroelements	Zeatin - 4 mg/l	OM mod. WPM	IBA - 4 mg/l IBA - 1 mg/l + NAA - 0.75 mg
Peixe et al. 2007	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Galega vulgar'	Single-node cuttings	OM (Rugini 1984)	Coconut water - 50 ml/l + BAP - 2.22 µM	OM	IBA - 3 g/l + activated charcoal - 2 g/l NAA - 5.37 µM IBA - 24.6 µM
OEPP/EPPO 2006	<i>Olea europaea</i> L.	Single-node cuttings	OM (Rugini 1984)	BA, NAA, ZR	½ OM	IBA (in dark)
Sghir et al. 2005	<i>Olea europaea</i> L., Moroccan and French olive cultivars	Nodal segments with axillary buds	OM (Rugini 1984)	Zeatin riboside (ZR) BA + NAA	OM	IBA (in dark)
Abousalim et al. 2005	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Moroccan Picholine'	Microcuttings	OM (Rugini 1984)	Zeatin - 5 mg/l	OM	NAA - 1 mg/l
Zacchini and De Agazio 2004	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Nebbiara'	Nodal segments with axillary buds	OM (Rugini 1984) MS (Murashige and Skoog, 1962)	Zeatin - 4.56 µM	½ OM	NAA - 3.22 µM (5-d dark pre-treatment)
Brhadda et al. 2003	(<i>Olea europaea</i> L.) cv. 'Moroccan Picholine'	Nodal segments with axillary buds	OM (Rugini 1984)	Zeatin - 5 mg/l	-	-
Mencuccini 2003	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Frantoio', 'Dolce Agogia' and 'Moraiolo'	Nodal segments with axillary buds	OM mod. (Mencuccini et al., 1997)	-	MS	NAA - 5 µM (in dark)
Santos et al. 2003	<i>Olea europaea</i> ssp. <i>madeirensis</i>	Nodal segments with axillary buds	OM (Rugini 1984) DKW (Driver and Kuniyuki, 1984)	Zeatin - 18.2 µM BA - 4.4 µM IBA - 0.4 µM	DKW	IBA - 20.7 µM
Grigoriadou et al. 2002	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Chondrolia Chalkidikis'	Single-node cuttings	WPM (McCown and Lloyd 1981)	Zeatin - 20 µM (+/- 4,3 mg/l)	WPM	IBA - 12 µM+ NAA - 3 µM + putrescine - 30 µM
Khan et al. 2002	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Leccino'	Single-node cuttings	MS (Murashige and Skoog, 1962)	GA₃ ; BAP ; 2iP	-	-
Roussos and Pontikis 2002	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Koroneiki'	Single-node cuttings	DKW mod. (Roussos et al. 1999)	ZR (zeatin riboside) - 1-2mg/l	½ WPM (dark pre-treatment)	IBA+NAA - 1+1, 2+2 e 4+4 mg/l
Chaari-Rkhis et al. 1999	<i>Olea europaea</i> L. - Tunisian olive cultivars	Microcuttings	MS (Murashige and Skoog, 1962)	Zeatin, Kinetine BA	MS	NAA - 2 mg/l
Otero and Do Campo 1998	<i>Olea europaea</i> L. cv. Arbequina	Single-node cuttings	OM (Rugini 1984)	Zeatin - 10 mg/l	OM	IBA - 3 mg/l NAA - 1 mg/l
Cozza et al. 1997	<i>Olea europea</i> L. cv 'Nocellara' and 'Nocellara del Belic'	Single-node cuttings	½ MS mod. (Fiorino and Leva, 1986) ½ OM (Rugini 1984)	TRANS-ZEATIN - 2.28 µM	½ OM	NAA - 8 µM IBA - 12.3 µM
Revilla et al. 1996	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Arbequina'	Cuttings from plants produced through micrografting	DKW (Driver and Kuniyuki, 1984)	BA - 4.4 µM IBA - 0.05 µM	½ DKW	IBA - 0.5 µM
Rama and Pontikis 1990	<i>Olea europaea sativa</i> L. cv. 'Kalamon'	Single-node cuttings	OM mod. (Rama and Pontikis, 1990)	ZR (zeatin riboside) - 10 mg/l	OM mod.	NAA - 2 mg/l + Crude extract - 50 mg/l
Rugini 1984	<i>Olea europaea</i> L. cv. 'Frantoio', 'Dolce Agogia' and 'Moraiolo'	Nodal segments with axillary buds	OM (Rugini, 1984)	Zeatina - 4 mg/l	½ MS	NAA - 1mg/l
Rugini and Fontanaza 1981	<i>Olea europaea</i> L. cv. "Dolce Agogia"	Single-node cuttings	½ MS (Murashige and Skoog, 1962)	ZR (zeatin riboside) - 10 mg/l IBA - 0.5 mg/l GA₃ - 0.5 mg/l	Knop's (1/2 macro)+ Heller. (micro)	NAA - 2 mg/l and 4 mg/l

As far as we know our laboratory is the only one that ever tried micropropagation of *Olea maderensis* (Brito 2000, Brito et al. 2003, Santos et al. 2003, Brito et al. 2007, Brito et al. 2009, Lopes et al. 2009) (see Chapters II.3, II.4 and II.5).

II.1.5 Research Objectives

During this PhD work, emphasis has been given in order to define strategies for valuation of vegetation areas of Porto Santo Island. From this point of view, it was defined a strategy for the propagation in large-scale of the endemic and endangered species *Olea maderensis* and the introduced *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*. The development of this work is very important, in order to be used in breeding programmes of Madeira Archipelago and to improve the genetic patrimony of this endemic species and preserve germplasm in field, and also to develop adequate methods to combat desertification.

In this context, the main goals of this work was to investigate and characterize native genotypes of *Olea maderensis* from Madeira and Porto Santo Islands and to preserve germplasm and reintroduce wild olive species in Porto Santo Island, using biotechnology techniques for large-scale propagation.

The specific objectives of this work were:

- Within the scope of germplasm evaluation and preservation of the several olive populations from Madeira Archipelago, there was a necessity to know better their taxonomic position. For that flow cytometry (FCM) and nuclear microsatellites (SSRs) were used to further investigate and characterize native genotypes from *Olea maderensis* and *Olea cerasiformis*, wild olives (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and cultivated olives (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*) (Chapter II.2).
- Optimization of the in vitro culture technique to propagate and preserve the endangered species *O. maderensis*. For this, improvement of the culture conditions is necessary, such as disinfection, the culture medium used and the conditioning of plants. Confirm the optimization conditions trough the evaluation of shoot performance (growth rates, leaf colour/abscission and physiological behaviour) (Chapter II.3).
- Evaluation of the potential of the protocol used for micropropagation of the wild olive species (the endemic *O. maderensis* and the introduced *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) for true-to-type propagation. For this FCM and SSRs

is used to assess ploidy clonal fidelity and genetic stability, respectively (Chapter II.4).

- Definition of successful field acclimatization protocol of *Olea maderensis* and evaluation of field performance of the micropropagated plants through the analysis of physiological parameters during the process (Chapter II.5).

References

- Abousalim A., Brhadda N., Loudiyi, D.W. (2005). Proliferation and rooting of juvenile and adult olive explants (*Olea europaea* L.): effects of cytokinin and auxins. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement vol. 9. Accessed 24 April 2008 in: <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=1336>.
- Ahmad N., Anis M. (2007). Rapid clonal multiplication of a woody tree, *Vitex negundo* L. through axillary shoots proliferation. Agroforestry Systems 71: 195–200.
- Binet M.N., Lemoine M., Martin C., Chambon C., Gianinazzi, S. (2007). Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 43 (5): 473-478.
- Brhadda N., Abousalim A., Loudiyi D.W., Benali D. (2003). Effects of culture medium on the micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Moroccan Picholine. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 7 (3–4): 177–182.
- Briccoli Bati, C., Godino G., Monardo D., Nuzzo V. (2006). Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars ‘Carolea’ and ‘Nocellara Etnea’. Scientia Horticulturae 109: 173–182.
- Brito G. (2000). Micropropagação de duas espécies autóctones da Ilha de Porto Santo (*Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe e *Juniperus phoenicea* L.) e estudo da resposta de rebentos *in vitro* a stress osmótico (Dissertação de Mestrado em Ciências das Zonas Costeiras), Universidade de Aveiro.
- Brito G., Costa A., Fonseca H., Santos C. (2003). Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* in vitro shoots to osmotic stress. Scientia Horticulturae 97: 411-417.
- Brito G., Jardim R., Coelho C., Santos C. (2007). Micropropagação de uma espécie autóctone de Porto Santo como estratégia de combate à desertificação: exemplo da oliveira brava. Silva Lusitana 15(2): 229-247.
- Brito G., Santos C. (2009). Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. Canadian Journal of Forest Research 39(4): 814-822.
- Canas L.A., Benbadis A. (1988). In vitro plant-regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Science 54: 65-74.
- Capelo J., Sequeira M., Jardim R., Costa J.C. (2004). Guia da Excursão Geobotânica dos V Encontros ALFA 2004 à Ilha da Madeira. In: Quercetea. Lousã M.F., Espírito Santo D., Capelo J.H. (eds.), Vol 6. ALFA, Lisboa, Portugal, pp 5- 45.

- Capelo J., Sequeira M., Jardim R., Mesquita S. (2007). Biologia e Ecologia das florestas das Ilhas – Madeira. In: Árvores e Florestas de Portugal – Açores e Madeira, a floresta das ilhas. Silva J.S. (ed.), Vol. 6. Público, Comunicação Social, S.A., Lisboa, Portugal, pp. 81-135.
- Casas R.R., Besnard G., Schönswetter P., Balaguer L., Vargas P. (2006). Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. Theoretical and Applied Genetics 113:575–583. Doi: 10.1007/s00122-006-0306-2.
- Chaari-Rkhis A., Trigui A., Drira N. (1999). Micropropagation of tunisian cultivars olive trees: preliminary results. Acta Horticulturae 474: 79-81.
- Colella C., Miacola C., Amenduni M., D’Amico M., Bubici C. Cirulli M. (2008). Sources of verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. Plant Pathology 57(3): 533-539. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01785.x.
- Cozza R., Turco D., Bati C., Bitonti M.B. (1997). Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 51: 215–223.
- Debergh P.C. (1988). Micropropagation of woody species – state of art on in vitro aspects. International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species. Acta Horticulturae 227: 52-54.
- Driver D., Kuniyuki, A. (1984). In vitro propagation of Paradox Walnut rootstock. Hortscience 19: 507-509.
- Fiorino P., Leva A.R., (1986). Investigations on the micropropagation of the olive (*Olea europaea* L.). Influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. Olea 17: 101–104.
- George E.F., Debergh P.C. (2007). Micropropagation: Uses and Methods. In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. The Background. George E.F., Hall M.A., Klerk G. (eds.). Springer, ISBN 1402050046, 9781402050046, pp. 29-64. Accessed 24 April 2008 in: <http://books.google.com>.
- Green P.S. (2002). A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). Kew Bulletin 57:91–140.
- Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P. (2002). In vitro propagation of the Greek olive cultivar ‘Chondrolia Chalkidikis’. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71: 47–54.
- Hatzopoulos P., Banilas G., Giannoulia K., Gazis F., Nikoloudakis N., Milioni D., Haralampidis K. (2002). Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. European Journal of Lipid Science and Technology 104: 574–586.

- Jain S.M, Häggman H. (2007). Preface. In: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Jain S.M, Häggman H. (eds.). Springer, ISBN 1402063512, 9781402063510. pp. ix. Accessed 24 April 2008 in: <http://books.google.pt>.
- Khan M.R., Rashid H., Quraishi A. (2002). In vitro shoot development from Juvenile cuttings of field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino. Journal of Biological Sciences 2(7): 438-440.
- Leva A., Muleo R., Petruccelli R. (1995). Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. Journal of Horticultural Science 70: 417-421.
- Leva A.R., Petruccelli R., Goretti R., Panicucci M. (1992). Ruolo di alcuni microelementi e carboidrati nella proliferazione 'in vitro' di cv. di olivo (*Olea europaea* L.). Proceedings of the Congress "Olive oil quality". Firenze, December, pp.333–334.
- Lopes T., Capelo A., Brito G., Loureiro J., Santos C. (2009). Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites. Trees 23: 29-36. Doi: 10.1007/s00468-008-0251-6.
- Marin-Zamora M., Garcia-Ferriz L., Ghorbel R., Ybarra M., Mari A. (2002). Effects of arbuscular mycorrhizae inoculation on micropropagated olive plants. Acta Horticulturae 586: 907-910.
- McCown, B.H., Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. Hortscience 16: 453-453.
- Mencuccini M. (2003). Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Scientia Horticulturae 97: 129-139.
- Mencuccini M., Rugini, E. (1993). In vitro shoot regeneration from olive cultivar tissues. Plant Cell Tissue and Organ Culture 32(3): 283-288.
- Mitrakos K., Alexaki A., Papadimitriou P. (1992). Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. Journal of Plant Physiology 15: 473-497.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-479.
- Negash L. (2003). Vegetative propagation of the threatened African wild olive [*Olea europaea* L. subsp. *cuspidata* (Wall. ex DC.) Cifrieri]. New Forests 26: 137–146
- OEPP/EPPO. (2006). Pathogen-tested olive trees and rootstocks. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36: 77-83. Accessed 16 June 2008 in: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118562423/PDFSTART>.
- Orinos T., Mitrakos K. (1991). Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 27: 183-187.

- Otero M.L., Do Campo D.M. (1998) Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina from juvenile cuttings. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 63(1-2): 133-140.
- Peixe A., Raposo A., Lourenço R., Cardoso H., Macedo, E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae* 113: 1–7.
- Pignatti G., Crobeddu S. (2005). Effects of rejuvenation on cutting propagation of Mediterranean shrub species. *Forest@ 2* (3): 290-295. Accessed 24 April 2008 in: <http://www.sisef.it/>
- Premkumar, A., Mercado J.A., Quesada M.A. (2001). Effects of in vitro tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158: 835-840.
- Rama P., Pontikis C.A. (1990). In vitro propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) 'Kalamon'. *Journal of Horticultural Science* 65(3): 347-353.
- Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R. (1996). In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 32 (4): 257-261.
- Rivas-Martínez S.L., Díaz T.E., Fernández-González F., Izco J., Loidi J., Lousã M., Penas A. (2002). Vascular plant communities of Spain and Portugal - Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. *Itinera Geobotanica* 15:5-922.
- Roussos P.A., Pontikis C.A. (2002). In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation* 37: 295–304.
- Rugini E. (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24:123-134.
- Rugini E. (1988). Somatic embryogenesis and plant-regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14: 207-214.
- Rugini E. (1995). Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (eds.). Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 171–189.
- Rugini E., Baldoni L. (2005). *Olea europaea* Olive. In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. Litz R.E. (ed.). CABI Publishing, ISBN 0851996620, 9780851996622. pp. 404-428. Accessed 24 April 2008 in: <http://books.google.com>.
- Rugini E., Fontanazza G. (1981). In vitro Propagation of an olive cultivar 'Dolce Agogia' olive. *Hortscience* 16: 492-493.

- Rugini E., Lambardi M. (2003). Micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.). In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Jain, S.M., Ishii, K. (eds.). Kluwer, Academic Publishers, Netherlands, pp. 621-646.
- Rugini E., Pesce P.G. (2006). Genetic improvement of olive. *Pomologia Croatica* 12: 43-74
- Santos C., Brito G., Pinto G., Fonseca H. (2003). In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *madeirensis*. *Scientia Horticulturae* 97: 83-87.
- Sequeira M., Jardim R., Capelo J. (2007). A chegada dos portugueses às ilhas – o antes e o depois – Madeira. In: Árvores e Florestas de Portugal – Açores e Madeira, a floresta das ilhas. Silva J.S. (ed.), Vol 6. Público, Comunicação Social, S.A., Lisboa, Portugal, pp. 165- 196.
- Sghir S., Chatelet P., Ouazzani N., Dosba F., Belkoura I. (2005). Micropropagation of eight Moroccan and French olive cultivars. *Hortscience* 40(1):193-196.
- Shibli R.A., Shatnawi M., Abu E., Al-Juboory K.H. (2001). Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 88: 243-256.
- Trabelsi E.B., Bouzid S., Bouzid M., Elloumi N., Belfeleh Z., Benabdallah A., Ghezal R. (2003). In-vitro regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. *Journal of Plant Biology* 46(3): 173-180.
- Vieira R. (1992). Flora da Madeira – O interesse das plantas endémicas macaronésicas. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa.
- Zacchini M., De Agazio M. (2004). Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum* 48(4): 589-592.

Capítulo II.2

Genetic characterisation of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers

Caracterização genética de árvores de oliveira do Arquipélago da Madeira utilizando técnicas de citometria de fluxo e marcadores moleculares

Chapter published as an original paper in a SCI journal:

Brito G., Loureiro J., Lopes T., Rodriguez E., Santos C. (2008). Genetic characterisation of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 657–664. DOI: 10.1007/s10722-007-9268-8.

Abstract

In this study, native olive plants from *Olea maderensis* (\equiv *O. europaea* ssp. *cerasiformis*) and *O. cerasiformis* (\equiv *O. europaea* ssp. *guanchica*), wild olives (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and cultivated olives (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*) were analysed with respect to genome size and microsatellite markers. The mean nuclear DNA content of *O. maderensis* was estimated as 5.97 ± 0.191 pg/2C, while the remaining studied taxa presented mean genome sizes ranging from 2.99 to 3.18 pg/2C. These data and the obtained SSR profiles, i.e., with two to four alleles in *O. maderensis* and a maximum of two alleles in the other taxa, enabled the identification of a new ploidy level, tetraploidy, for a species belonging to *Olea* genus. Cluster analysis of the microsatellite data revealed a clear separation of each species in different clusters and a high genetic dissimilarity could be observed among genotypes belonging to different species. This work contributed to a better characterization of olive species and the obtained data can be helpful to support taxonomic studies, and to develop germplasm preservation strategies in endangered populations of *O. maderensis* from Madeira Archipelago.

Keywords: genetic diversity; genome size; nuclear DNA content; *Olea* sp., Oleaceae; SSR markers

II.2.1 Introduction

The olive tree (*Olea europaea* L., Oleaceae) is a highly important and worldwide distributed fruit crop that possesses the largest geographic distribution within this genus. Green (2002) described six subspecies of *Olea europaea*: ssp. *europaea* is a distinctive element of the Mediterranean Basin flora and serves to characterise both natural (var. *sylvestris* Brot.) and agricultural (var. *europaea*) ecosystems; ssp. *guanchica* P. Vargas, J. Hess, Muñoz Garm. & Kadereit occurs in Canary Islands; ssp. *cerasiformis* Webb & Berth. ex Kunkel and Sunding [previously named by Vieira (1992) as *Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe] is native from the Madeira Archipelago; ssp. *maroccana* (Greut. & Burd.) P. Vargas, J. Hess, Muñoz Garm. & Kadereit occurs in the South-West Morocco; ssp. *laperrinei* (Batt. & Trab.) Cif. can be found in Agadir, Jebel Marra and Hoggar Mountains; and ssp. *cuspidata* (Wall. ex G. Don) Cif., which is widely distributed in South and East Africa, Arabian Peninsula and Central Asia.

This taxonomical classification of *Olea europaea*, particularly the recognition of *O. europaea* ssp. *guanchica* as an independent taxon from *O. europaea* ssp. *cerasiformis*, is based on data from allozyme variation (Ouazzani et al. 1993), molecular markers (Hess et al. 2000) and morphological characters (Vargas et al. 2001). Despite of the strong molecular evidence obtained by Hess et al. (2000), which suggested that the populations of ssp. *cerasiformis* from Madeira and the Canary Islands did not form a natural group, the morphological analysis performed by Vargas et al. (2001) supported the creation of a new subspecific taxon but not a specific status of both taxa. However, Rivas-Martínez et al. (2002), seemed to find enough evidences for creating new combination taxon names, with *O. europaea* ssp. *cerasiformis* being elevated to *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco and *O. europaea* ssp. *guanchica* to *Olea cerasiformis* Rivas Mart. & Del Arco. With the respective doubts, and until further clarification by the scientific community, this most updated taxonomical nomenclature has been chosen and followed throughout this manuscript.

Until now, most of the studies concerning the genetic diversity of *O. europaea* were based on molecular markers (e.g. Gemas et al. 2004, Baali-Cherif and Besnard 2005). Moreover, in a recent study, Loureiro et al. (2007a) successfully applied flow cytometry (FCM) to analyse the genome size variation among olive cultivars and between them and wild olive. Since the beginning of 1990s, FCM has been the preferred technique for large screening of the ploidy level of germplasm accessions (e.g. Bartoš et al. 2005) and for taxa delimitation by means of genome size data (e.g. Hcini et al. 2006).

Nonetheless, for a more complete genetic characterization of population's variability, molecular markers, as microsatellites or simple sequence repeats (SSRs), should also be analysed. In olive, SSRs became the markers of choice for variability studies (Rallo et al. 2000, Sefc et al. 2000, De la Rosa et al. 2002) and have been successfully used in a wide range of applications such as genotype/cultivar identification (e.g. Rotondi et al. 2003), diversity studies (e.g. Belaj et al. 2003, Baali-Cherif and Besnard 2005) and genome mapping (e.g. Wu et al. 2004).

In this work, FCM and nuclear microsatellites were used to further investigate and characterize native genotypes of *Olea maderensis* from Madeira and Porto Santo Islands. Several genotypes of wild olive (var. *sylvestris*) growing in Porto Santo Island, of *Olea cerasiformis* from Las Palmas Island and of cultivated olive (var. *europaea*) from mainland Portugal, were also analysed using both techniques. It is expected that the outcome of this work supports further taxonomic studies and increases the knowledge of the genetic diversity of the *Olea* genus in general, and of native olives from the Macaronesia, in particular. Furthermore, this genetic characterization, by providing highly reliable information, may become an efficient tool in germplasm conservation and management strategies of endangered populations in these Islands.

II.2.2 Materials and methods

Plant material

Plant material from 20 healthy mature field trees was collected between 2004 and 2006 (Table II.2.1): seven individuals belong to *O. maderensis*, three to *O. cerasiformis*, eight to *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* and two to *O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*. The overall number of *O. maderensis* individuals is not only reduced but also located on sites of difficult access, only reachable with the assistance of a specialised cliffhanging team. Voucher specimens were collected and kept in the Herbarium of the University of Aveiro (AVE).

Table II.2.1 - List of accessions used for simple sequence repeats (SSRs) PCR amplifications and flow cytometric (FCM) analysis of olive with information at subspecific level, location, genotype identification, and collector's name.

Species	Subspecies and variety	Localities	Genotype	Collector	SSRs	FCM
<i>O. maderensis</i>		Porto Santo: Pico Branco	OG11	BGM	✓	✓
<i>O. maderensis</i>		Porto Santo: Pico de Ana Ferreira	OG12	L. Silva	✓	✓
<i>O. maderensis</i>		Madeira: Ribeira Brava	OG4	BGM	✓	✓
<i>O. maderensis</i>		Madeira: Ribeira Brava	OG9	BGM	✓	✓
<i>O. maderensis</i>		Madeira: Ribeira Brava	OG27	BGM	✓	✓
<i>O. maderensis</i>		Madeira: Câmara de Lobos	OG10	BGM	✓	✓
<i>O. maderensis</i>		Madeira: São Gonçalo	OG29	BGM	✓	✓
<i>O. cerasiformis</i>		La Palma: Breña Baja	OG19	CP	✓	✓
<i>O. cerasiformis</i>		La Palma: Breña Baja	OG21	CP	<i>a</i>	✓
<i>O. cerasiformis</i>		La Palma: Breña Baja	OG22	CP	<i>a</i>	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Pico do Castelo	OG0	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Pico do Castelo	OG1	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Pico do Castelo	OG2	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Pico do Castelo	OG3	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Pico do Castelo	OG13	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Sítio do Farrobo	OG5	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Sítio do Tanque	OG6	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	Porto Santo: Quinta das Palmeiras	OG17	C. Afonso	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i> cv. ?	Portugal: Aveiro	OG24	G. Brito	✓	✓
<i>O. europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i> cv. ?	Portugal: Aveiro	OG25	G. Brito	✓	✓

Note: BGM – Botanic Garden of Madeira (collectors: Roberto Jardim and Olga Baeta); CP - Cabildo de La Palma, kindly provided by Dom Miguel Ángel Morcuende (collector: Félix Medina); *a* - recalcitrant genotypes for SSR analysis; ? - unknown cultivar.

Nuclear DNA content analyses

Field collected leaves were maintained in moistened paper and analysed after a maximum period of three days. Nuclear suspensions were obtained from half a young leaf

according to the protocol described by Galbraith et al. (1983) with the modifications presented in Loureiro et al. (2007a). Leaves of *Pisum sativum* cv. Ctirad with a 2C value of 9.09 pg DNA (Doležel et al. 1998) were used as internal reference standard. Nuclei homogenates were prepared in LB01 buffer, and 50 µg mL⁻¹ of both propidium iodide (PI; Fluka, Buchs, Switzerland) and RNase (Fluka) were added to samples; then and after a 5 min incubation, samples were analysed in a Beckman Coulter® EPICS XL flow cytometer (Hialeah, FL, USA). At least three replicates were analyzed per genotype, usually in three different days. In each sample, fluorescence and scatter properties of at least of 5,000 nuclei were assayed. The nuclear genome size of each sample (see Table II.2.2) was estimated according to:

$$\text{Sample 2C nuclear DNA content (pg)} = \frac{\text{Sample } G_0/G_1 \text{ peak mean}}{P. sativum G_0/G_1 \text{ peak mean}} \times 9.09$$

Conversion into base-pair numbers was performed using the factor: 1 pg = 978 Mbp (Doležel et al. 2003).

SSR analyses

Genomic DNA was extracted from 80 mg of leaves and flowers with the DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN™, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were estimated spectrophotometrically and by electrophoresis, using a comparison with a standard MW marker (lambda *Hind*III, NEB).

Ten microsatellites were selected as being the most polymorphic ones available (Table II.2.3) and two different studies were followed for PCR amplification (Sefc et al. 2000; De la Rosa et al. 2002). One of each set of two primers was labelled with a fluorescent dye (ABI dyes: 6-FAM or HEX). Capillary electrophoresis was performed on an automated sequencer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the GeneScan internal size standard labelled with ROX (PE Applied Biosystems) was used. The presence (1) and absence (0) of alleles for each microsatellite marker were recorded for each genotype. For reproducibility testing, duplicate samples were run for five of the samples.

Statistical analyses

Genome size data obtained using FCM was analysed using a one-way ANOVA on Ranks (SigmaStat for Windows Version 3.1, SPSS Inc., Richmond, CA, USA) and the Dunn's method was used for pair-wise comparison. The binary data obtained from microsatellite marker analyses were used to compute pairwise similarity coefficients using

Dice (adapted from Nei and Li 1979) and Jaccard similarity indices (Jaccard 1908, Sneath and Sokal 1973). Similarity matrices were subjected to cluster analysis using UPGMA algorithm on NTSYS, version 2.0 (Rohlf 1998).

II.2.3 Results and discussion

Genome size estimations of *O. maderensis* individuals revealed a mean nuclear DNA content of 5.97 ± 0.191 pg of DNA (Table II.2.2). This value is almost the double of that obtained for individuals of *O. cerasiformis* (mean $2C = 2.99 \pm 0.053$ pg) and slightly less than the double for the estimations obtained for genotypes of wild olive (mean $2C = 3.18 \pm 0.043$ pg) and cultivated olive (mean $2C = 3.10 \pm 0.028$ pg). With exception of *O. maderensis* individuals, low standard deviations of $2C$ nuclear DNA content were obtained.

Table II.2.2 – Nuclear DNA content of olive taxa analysed in this study using flow cytometry. The values are given as mean and standard deviation of the mean (SD) of the nuclear DNA content (pg/2C) and as mean of the 1C genome size in Mbp. The range of values (min. – minimum, max – maximum) obtained for each taxa, the mean coefficient of variation (CV, %) of the $2C$ peak and the number of genotypes tested (n) are also given.

Species	Subspecies and variety	Nuclear DNA content (pg/2C)				1C genome size (Mbp)**	CV (%)	n
		Mean*	SD	Min.	Max.			
<i>Olea europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	3.18a	0.043	3.07	3.28	1,555	3.68	8
<i>Olea europaea</i>	<i>europaea</i> var. <i>europaea</i>	3.10ab	0.028	3.06	3.15	1,516	2.66	2
<i>Olea cerasiformis</i>	-	2.99b	0.053	2.94	3.13	1,462	3.25	3
<i>Olea maderensis</i>	-	5.97c	0.191	5.59	6.19	1,460	3.14	7

* Means followed by the same letter are not statistically different according to Dunn's method at $P \leq 0.05$.

** 1 pg DNA = 978 Mbp according to Doležel et al. (2003).

In *O. maderensis*, the heterogeneity found is due to the occurrence of two groups of values: in four individuals $2C$ values ranged from 5.95 to 6.14 pg, while in three of them the range was between 5.64 and 5.72 pg. However, no correlation between locality (i.e. Island) and genome size of *O. maderensis* individuals could be found. The genome size estimations obtained for the wild and the cultivated olives are in perfect agreement with the results obtained by Loureiro et al. (2007a) that reported $2C$ nuclear content values

ranging between 2.90 and 3.07 pg for six cultivars of *O. europaea* and a mean 2C value of 3.19 pg for *O. europaea* var. *sylvestris*. Despite being recalcitrant species for nuclear isolation and posterior analysis by FCM (Loureiro et al. 2007a), mean CV values of DNA peaks were all below 4.0 % (Table II.2.2; Figure II.2.1).

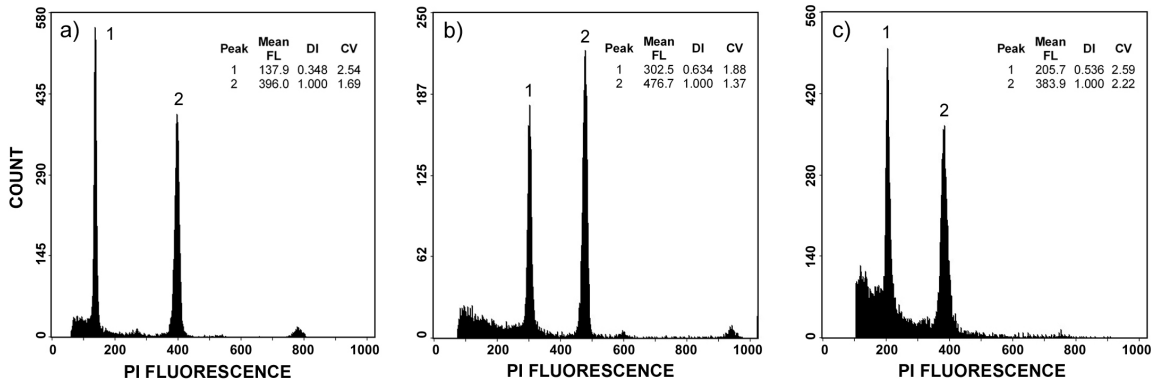


Figure II.2.1 - Histograms of relative fluorescence intensity obtained after simultaneous analysis of nuclei isolated from *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9.09 pg DNA, internal reference standard) and: a) *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* (genotype OG0); b) *O. maderensis* (genotype OG10). In histogram c) *O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea* (genotype OG25) was used as sample material and *O. maderensis* (genotype OG4) as internal standard. In any histogram the following peaks are marked: 1 – nuclei at G₀/G₁ phase of sample; 2 – nuclei at G₀/G₁ phase of internal standard. The mean channel number (mean FL, channel number in arbitrary units), DNA index (DI = mean channel number of sample/mean channel number of reference standard) and coefficient of variation value (CV, %) of each peak are also given.

The genetic variability of wild olive genotypes was assessed using 10 microsatellite markers. Amplification of the SSR markers was performed using 10 primer pairs that produced 106 reproducible fragments/alleles that ranged from 95 bp (locus AJ416322) to 264 bp (locus AJ279854) in size (Table II.2.3). All loci were found to be polymorphic with 6 alleles detected at the least variable loci (AJ416320 and AJ416321) and 17 at the most variable locus (AJ279865). Allele size was well within the values described in literature (Sefc et al. 2000, De la Rosa et al. 2002), for the given species.

In *O. maderensis* genotypes, SSRs profiles presented 2 to 4 bands (alleles), while individuals of the remaining taxa presented banding patterns with a maximum of two bands (alleles) (Figure II.2.2). These data together with the results of genome size estimation using flow cytometry, indicates that *O. maderensis* individuals are tetraploid, while *O. cerasiformis*, *O. europaea* var. *sylvestris* and *O. europaea* var. *europaea* individuals are diploid.

Table II.2.3 - Characteristics of the microsatellite loci amplified in *O. europaea*. Ta is the optimal annealing temperature. Number of alleles and allele size range (bp) found in this study and in the original publications (in parenthesis) are also given.

Locus	Repeat motif	Ta (°C)	No. of alleles	Allele size range (bp)
AJ279854 ^(a)	(GA) ₁₉	50	10 (9)	206-264 (228–250)
AJ279856 ^(a)	(GA) ₁₈	50	11 (6)	131-219 (195–211)
AJ279858 ^(a)	(GA) ₁₈	55	11 (7)	117-151 (123–139)
AJ279859 ^(a)	(GA) ₂₃	55	13 (11)	165-201 (161–205)
AJ279865 ^(a)	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	50	17 (15)	128-178 (120–178)
AJ279867 ^(a)	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	50	16 (10)	160-204 (168–184)
AJ416320 ^(b)	(AG) ₅ -G-(GA) ₁₀	60	6 (9)	135-211 (201-243)
AJ416321 ^(b)	(CA) ₇	60	6 (7)	195-215 (205-215)
AJ416322 ^(b)	(CT) ₄ (CA) ₈	60	7 (6)	95-140 (118-139)
AJ416323 ^(b)	(AC) ₈	50	9 (7)	181-195 (183-196)

^(a) From Sefc et al. (2000), results here for *O. europaea* ssp. *europaea* only.

^(b) From De la Rosa et al. (2002), results here for 23 cultivars of *O. europaea* ssp. *europaea*.

Genetic similarity (GS) coefficients (Dice and Jaccard) and the resulting dendrograms were very similar, therefore we will only show and discuss those obtained from Jaccard distances.

The GS coefficients for all possible pairs of the 18 genotypes tested were calculated and the resultant matrix ranged from 0.05 to 1. The dendrogram obtained from the similarity matrix (Figure II.2.3), shows very low levels of GS and indicates the presence of a high degree of variation among all the genotypes tested. However, it was possible to separate in different clusters. Genotype OG19 that corresponds to *O. cerasiformis* from Las Palmas Island does not group with any other genotype, suggesting a high phylogenetic distance between this taxon and the other studied taxa. Also OG27 and OG29 from Madeira Island do not group with the other genotypes of *O. maderensis*. In the remaining taxa, two major clusters are also evident: 1) individuals of *Olea maderensis* from Porto Santo and Madeira Islands, and 2) individuals of wild olive from Porto Santo Island and cultivated olive from mainland Portugal (with a high degree of GS). Also, both genotypes (OG24 and OG25) from Portugal appear to belong to the same cultivar as, notwithstanding the fact that the cultivar is unknown, they are morphologically very similar.

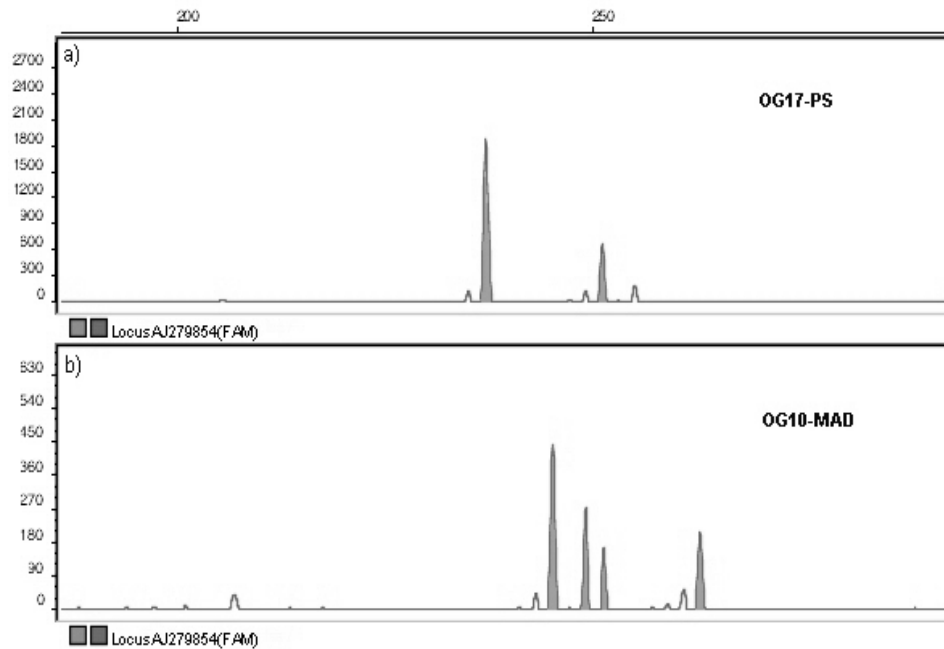


Figure II.2.2 - Amplification of the ssrAJ279854 (FAM) locus in: (a) one genotype of *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* (OG17 from Porto Santo Island); and (b) one genotype of *O. maderensis* (OG10 from Madeira Island). Electropherogram (a) shows a heterozygous individual with two alleles of about 237 and 251 bp. Electropherogram (b) shows a heterozygous individual with four alleles of about 245, 249, 251 and 263 bp. Top scale indicates fragment size in nucleotides. Left scale indicates fluorescence intensity measured in relative fluorescence units.

The superimposing of genome size data in the dendrogram obtained using the microsatellite marker analysis revealed a good agreement between both techniques, with the two major clusters corresponding to each of the two identified ploidy levels (Figure II.2.3). These results are in accordance with previous reports where genetic distinctiveness of Madeiran olive was suggested by the occurrence of a unique allele at the phosphoglucose isomerase locus (Ouazzani et al. 1993) and by a distinct lineage of *O. maderensis* revealed by molecular markers as internal transcribed spacer 1 (ITS-1), randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD) and intersample sequence repeats (ISSR) (Hess et al. 2000).

According with the differences on genome size and microsatellite banding patterns between *O. maderensis* and wild olive it seems that these taxa have a different origin. The introduction of wild olive in Porto Santo Island seems much more recent, as data from the Regional Forestry Management Services points for an introduction of *O. europaea* var. *sylvestris* around 1950s in an attempt to solve desertification and erosion problems of this island (Andrada 1990). Also, considering that *O. maderensis* populations are few and

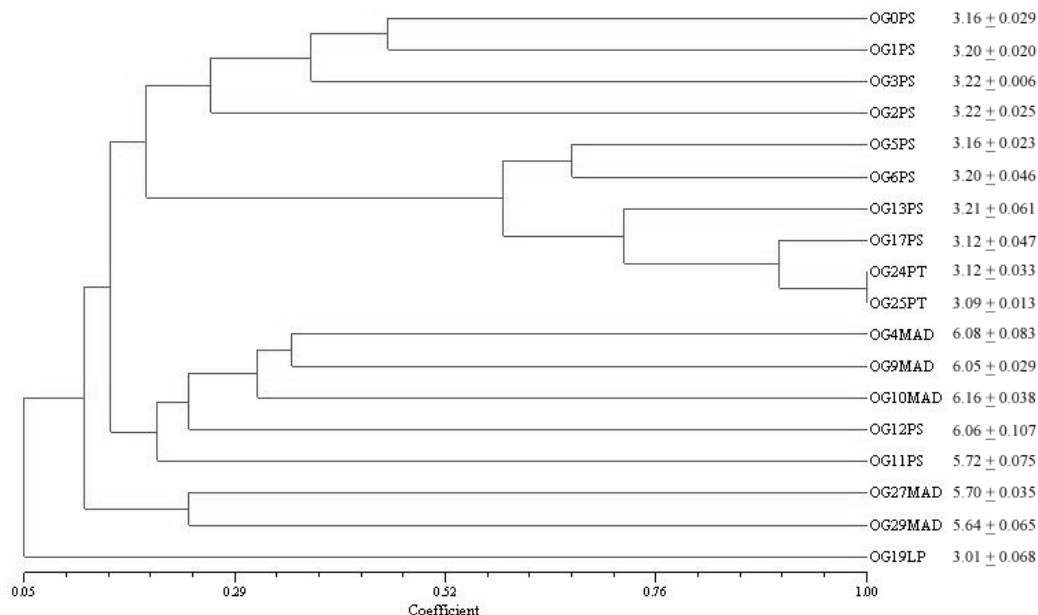


Figure II.2.3 - Dendrogram resulting from cluster analysis of the Jaccard genetic similarity matrix among 18 genotypes of olive. Genome size of each genotype is presented in a separate column. PS – Porto Santo Island; MAD – Madeira Island; LP – La Palma Island and PT – Portugal.

located in almost inaccessible sites, it seems that little or no gene flow takes place between the native and cultivated olives in Madeira Archipelago. Therefore, the two ranges of nuclear DNA content found in *O. maderensis*, supported by a high genetic dissimilarity between the genotypes that fall in each DNA range, suggest that possibly more than one colonization period took place in Madeira Archipelago.

Concerning the taxonomy dichotomy of *Olea europaea*, and despite of the fact that these techniques provided new evidences for a separation of *O. maderensis* from the remaining taxa, it remains to be studied whether in the genus the number of chromosomes is an important character for delimitation of new species. In other genus, as *Festuca* sp., karyological analyses are an important tool for delimitation of new taxa, which sometimes are not so easily separated by morphoanatomic studies (Loureiro et al. 2007b). With respect to microsatellites, Cipriani et al. (2002) and Rotondi et al. (2003) were able to identify olive cultivars using this technique.

In conclusion, both FCM and SSRs contributed to an even better characterization of these species and enabled the detection of a new ploidy level, tetraploidy, in the *Olea* genus. We expect that this information will support additional taxonomic approaches and help in clarifying the classification of these species. Furthermore, it was also possible to

find high genetic diversity between genotypes of *O. maderensis* in Madeira Archipelago and between *O. maderensis* and *O. cerasiformis*. By their reliable genetic information, these data are therefore important for establishing priority strategies for conservation programs, currently in course, of native and rare genotypes present in these islands.

Acknowledgments

Authors thank Direcção Regional de Florestas and Secretaria Regional da Educação from Madeira Autonomous Region and Porto Santo Town Hall. Thanks are also due to the FCT project (POCTI/AGR/60672/2004) that supported this work. FCT also supported the fellowships of Tina Lopes (FCT/SFRH/BPD/6012/2001), João Loureiro (FCT/SFRH/BD/9003/2002) and Eleazar Rodriguez (FCT/SFRH/BD/27467/2006).

References

- Andrada E.C. (1990). Repovoamento florestal no Arquipélago da Madeira (1952-1975). Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Direcção-Geral das Florestas Lisboa.
- Baali-Cherif D., Besnard G. (2005). High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Annals of Botany* 96:823–830.
- Bartoš J., Alkhimova O., Doleželová M., De Langhe E., Doležel J. (2005). Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. *Cytogenetic and Genome Research* 109:50-57.
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP, and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics* 107:736-744.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 104:223–228.
- De la Rosa R., James C.M., Tobutt K.R. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes* 2:265–267.
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Lysák M.A., Nardi L., Obermayer R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82:17-26.
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A:127–128.
- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. *Science* 220:1049–1051.
- Gemas V.J.V.; Almadanim M.C., Tenreiro R., Martins A., Fevereiro P. (2004). Genetic diversity in the olive tree (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:501–511.
- Green P.S. (2002). A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin* 57:91–140.

- Hcini K., Walker D.J., Bouzid S., González E., Frayssinet N., Correal E. (2006). Determination of ploidy level and nuclear DNA content in Tunisian populations of *Atriplex halimus* L. Genetic Resources and Crop Evolution 53:1-5.
- Hess J., Kadereit W., Vargas P. (2000). The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). Molecular Ecology 9:857-868.
- Jaccard P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles 44:223-270.
- Loureiro J., Rodriguez E., Costa A., Santos C. (2007a). Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. Genetic Resources and Crop Evolution 54:21-25.
- Loureiro J., Kopecký D., Castro S., Santos C., Silveira P. (2007b). Flow cytometric and cytogenetic analysis of Iberian Peninsula *Festuca* spp. Plant Systematics and Evolution 268: 89-105. Doi: 10.1007/s00606-007-0564-8.
- Nei M., Li W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science 76: 5269–5273.
- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P., Di Gusto F. (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive tree (*Olea europaea* L.). Journal of Heredity 84:34-42.
- Rallo P., Dorado G., Martín A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.) Theoretical and Applied Genetics 101:984–989.
- Rivas-Martínez S.L., Díaz T.E., Fernández-González F., Izco J., Loidi J., Lousã M., Penas A. (2002). Vascular plant communities of Spain and Portugal - Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. Itinera Geobotanica 15:5-922.
- Rohlf F.J. (1998). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0. Applied Biostatistics, New York.
- Rotondi A., Magli M., Ricciolini C., Baldoni L. (2003). Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. Euphytica 132:129–137.
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues dos Santos M., Laimer Da Câmara Machado M., Da Câmara Machado A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Molecular Ecology 9:1171-1173.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman WH, San Francisco, pp. 573.

- Vargas P., Muñoz G.F., Hess J., Kadereit J.W. (2001). *Olea europaea* ssp. *guanchica* and ssp. *maroccana* (Oleaceae) two new names for olive tree relatives. *Anales del Jardin Botanico Madrid* 58: 360-361.
- Vieira R. (1992) *Flora da Madeira – O interesse das plantas endémicas macaronésicas*. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa.
- Wu S.B., Collins G., Sedgley M. (2004). A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome* 47:26-35.

Capítulo II.3

Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies

Optimização do meio de cultura basal para a micropropagação rotineira de
Olea maderensis: estudos comparativos de fisiologia

Chapter published as an original paper in a SCI journal:

Brito G., Santos C. (2009). Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. Canadian Journal of Forest Research 39(4): 814-822. DOI: 10.1139/X09-011.

Abstract

The routine micropropagation *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco requires an adequate basal medium. To find the optimal medium, shoots were grown on four different media: olive medium (OM), and three modified OM media enriched with 2, 4 and 10 times the iron (Fe), magnesium (Mg), and manganese (Mn) of the OM medium, respectively (OMG, OMG₄ and OMG₁₀). For elongation-proliferation stage, media were supplemented with 9.12 μ M of zeatin. Doubling Fe, Mg and Mn concentrations (OMG) provided green and healthy shoots, while in other media leaf chlorosis or necrosis and abscission occurred because of either deficiency (OM) or toxicity of the elements (OMG₄ and OMG₁₀). Shoots grown in OMG medium also had the highest elongation-proliferation rates. Physiological studies were then performed only between OMG- and OM-grown shoots. Chlorophyll *a* and *b* contents and fluorescence (F_v , F_m) were higher in OMG-grown shoots. Doubling the concentration of Fe, Mg and Mn (which are important in photosynthesis) stimulated leaf survival and photosynthesis. OMG-grown leaves had higher Mg, Fe and Mn levels. Compared with field leaves, in vitro leaves had higher protein contents. Other physiological parameters (membrane integrity, water content and osmolality) did not differ between the two media. The best rooting rates were obtained for shoots on OMG (>85%) and plants were successfully acclimatized. These studies improved the efficiency and quality of micropropagation of *O. maderensis*, thereby allowing germplasm preservation of this endangered species.

Keywords: culture medium composition, micropropagation, olive, OM medium, physiological parameters, photosynthesis

II.3.1 Introduction

Olea maderensis (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco (wild olive) is an endemic and endangered forest tree of Madeira Archipelago, the remnants of which, mostly small or single-tree stands, occur in rocky mountain slopes. *Olea maderensis* is an important component of the archipelago's forest community (named Zambujal) (Brito et al. 2008). This species grows under a dry climate, on nutritionally poor soils that are, however, often (e.g. in Porto Santo Island) rich in iron (Fe), magnesium (Mg) and manganese (Mn), because of their magmatic nature (Albarède 2007). Because *O. maderensis* is an endangered species (Brito et al. 2008), it is important to develop new strategies for its propagation and germplasm preservation (e.g. by micropropagation).

Olea maderensis propagation through seeds is hindered by poor germination and the difficulty of obtaining seeds, and conventional propagation methods (e.g. own-rooted cuttings) are rather slow. To overcome these problems, tissue culture techniques offer a viable tool for plant mass propagation and multiplication (Briccoli Bati et al. 2006).

Olive (*O. europaea* L.) micropropagation has been achieved for many genotypes (Rugini 1984, Cozza et al. 1997, Grigoriadou et al. 2002, Roussos and Pontikis 2002, Mencuccini 2003, Santos et al. 2003, Zacchini and De Agazio 2004, Peixe et al. 2007), mostly using the basal Olive Medium (OM). This medium was formulated by analysing nutrient contents and ratios in olive apical shoots and zygotic embryos, and has proven to be very beneficial to olive micropropagation all over the world.

However, both physical characteristics (Stenvall et al. 2005, Naydenov et al. 2006) and nutrient demands (Ramage and Williams 2002, Brassard et al. 2003) vary within species and genotypes. In preliminary studies *O. maderensis* shoots grew at high rates when the Fe, Mg and Mn concentrations of OM were doubled (OMG) (Brito et al. 2007), but the physiology of shoots or plants grown on OM was not compared with that of shoots or plants grown on OMG. Therefore, more studies are needed to design new OM adjustments or other new medium formulations to improve micropropagation of this wild olive species.

Symptoms often associated with nutrient deficiency during micropropagation are reduced growth (Kothari et al. 2004), leaf chlorosis and abscission (De la Gaurdia and Alcántara 2002). Leaf chlorosis may be due to insufficient supply of nutrients required to photosynthesis (e.g. Fe, Mg and Mn). An extra supply of these nutrients may minimize chlorosis or abscission in sensitive species or genotypes (e.g. species that as *O.*

maderensis naturally grow on Fe-, Mg-, and Mn-rich soils) and improve shoot-plant growth and general performance.

Several parameters (e.g. chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, membrane integrity, water content, osmolality, soluble protein content and mineral composition) have been used successfully to measure in vitro plant responses to growth conditions, thereby providing important information regarding shoot or plant oxidative stress as well as water or nutrient status (Premkumar et al. 2001, Brito et al. 2003; 2007, Oliveira et al. 2008).

The main goal of this work was to adjust the nutrient composition of the OM medium to improve micropropagation of *O. maderensis*, thereby contributing to large-scale propagation and germplasm preservation of this endangered species. To this end, shoots were grown on OM and OM basal modifications. In vitro shoot performance (e.g. growth rates, leaf colour, abscission) and physiological analyses were assessed and compared with those of mother plants. These data were used to support the selection of the optimal medium for large-scale micropropagating this species.

II.3.2 Materials and methods

Micropropagation studies

Plant material

Cuttings from field-grown adult *Olea maderensis* trees (> 30 years) from Madeira and Porto Santo Islands were collected in the winter. Cuttings were treated with a 1 g.L⁻¹ Benlate® (Rhône-Poulenc) solution for 1 day. Leaves were then removed from the cuttings and the cuttings were washed in tap water for 10 min, immersed in 70% (v/v) ethanol for 30 s, soaked twice in 30% (v/v) commercial bleach (Domestos®, <5% of active chlorine) for 10 min, washed three times with sterile water, and finally immersed in 1 g.L⁻¹ Benlate® solution for 10 min.

In vitro culture establishment and shoot proliferation

Disinfected cuttings, comprising one or two axillary bud(s), were placed on one of the four induction medium: (i) Olive medium (OM); (ii) OM with twice the concentrations of FeNaEDTA, MgSO₄ and MnSO₄ (OMG₂); (iii) OM with four times the concentrations of FeNaEDTA, MgSO₄ and MnSO₄ (OMG₄); and (iv) OM with ten times the concentrations of

FeNaEDTA, MgSO₄ and MnSO₄ (OMG₁₀). All media were supplemented with 3% (w/v) sucrose, 0.7% (w/v) agar and pH adjusted to 5.8.

Cuttings were cultivated in groups of four to five explants per glass vessel. This procedure was carried out for a total of 20 glass vessels ($n \geq 80$ explants) for each culture media experiment ⁶. To induce sprouting, cultures were incubated, for 1 month in a growth chamber at 22 ± 1 °C, with a photoperiod of 16 h and an average light intensity of $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

The sprouted shoots were then transferred to elongation-proliferation medium, consisting on the same basal medium as that used for induced (OM, OMG, OMG₄ and OMG₁₀), but supplemented with $9.12 \mu\text{M}$ zeatin. Stock material was obtained by subculturing shoots monthly (maintained under the growth chamber conditions described above). Each time, shoots were cut into two segments, the apical segment (with the apical meristem and one or two axillary meristems) and the basal segment (with three to four axillary meristems).

Shoot proliferation experiments lasted for 5 weeks. For each of the four media, three experiments were conducted in which the following growth parameters were measured on 14 shoots: shoot elongation, number of new leaves, number of necrotic leaves, number of new nodes, number of new axillary shoots and callus diameter. The proliferation rate was evaluated by counting the number of the new axillary shoots, considering that every new shoot could be used as a new explant for further subcultures.

Plant Rooting

Apical segments with two or three nodes, grown in OM and OMG elongation-proliferation media, were used in rooting experiments. For rooting assays, only the two basal media that produced actively growing shoots with no necrotic symptoms were used at half strength ($\frac{1}{2}$ OM, $\frac{1}{2}$ OMG). Rooting media were supplemented with $3.22 \mu\text{M}$ NAA (Brito et al. 2007). Cultures were incubated in the dark for 5 days and then transferred to light conditions as above. Response was monitored for 2 months. After this period the number of rooted plantlets was recorded and expressed in terms of rooting percentage.

Plant acclimatization

Since OMG provided the highest number of plantlets, only OMG-derived plantlets were used in the acclimatization assays. When two to four roots 5-10 cm in length were developed, in vitro plantlets were transferred to a sterilised mixture of peat:vermiculite

⁶ As all explants from Porto Santo Inland developed fungus infection after 1-2 months in vitro, all experiments/measurements were performed with the genotype from Madeira Island.

(1:3, w/w) wet with $\frac{1}{2}$ OMG liquid medium (with no sucrose or growth regulators), and maintained in vitro for 2 weeks under the growth-chamber conditions described above. Plants were then transferred to a growth cabinet with the same temperature, photoperiod, and light intensity as before, but with progressive decrease of relative humidity (up to 70% RH). An occasional treatment with 1 g.L^{-1} of fungicide solution Benlate® was made.

Physiological studies

Comparative physiological studies were performed among OM- and OMG-grown shoots and the field mother plant.

Plant material

Leaves from mother plant and from long-term in vitro cultures (1 year of shoot subcultures on elongation-proliferation stage) on OM or OMG media were collected and treated separately for determination of the parameters described below. For water content, mineral composition and soluble protein content, results were averaged for groups of three leaves removed from the third to fourth nodes of three independent shoots growing on each medium. For chlorophyll content and fluorescence analyses, results were averaged for groups of three leaves removed from the third to fourth nodes of six independent shoots growing on each medium. For osmolality and membrane permeability, results were averaged for one leaf removed from the second node of three independent shoots growing on each medium.

Water content and osmolality

Water content was determined by the difference between fresh weigh (FW) and dry weigh (DW), after drying samples at 60°C until weight stabilisation. For osmolality analysis, samples were submitted to freeze-unfreeze cycles to assure membrane rupture (Vieira Santos et al. 2001). Osmolality was determined by analysing samples of leaves using an automatic osmometer (Knauer, Berlin, Germany).

Mineral composition

Mineral content was determined in leaves, dried at 60°C until weight stabilisation. Dried tissues were mineralised following procedures described by Azevedo et al. (2005) to determine the content of K, P, Ca, Mg, Mn, Fe, B, Cu and Zn elements. Elemental contents were determined by Induced Coupled Plasma Spectroscopy using a Jobin Ivon JY70 Plus, France (Santos and Caldeira 1999).

Soluble protein content

Tissue samples (0.5 g) were homogenized at 4 °C in 1 mL of 0.05 mol.L⁻¹ potassium phosphate buffer (pH=7.8) containing 0.1 mmol.L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid, 5 mmol.L⁻¹ cysteine, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, and 0.2 % Triton X-100 (Olmos et al. 1994). Homogenates were filtered and centrifuged at 8000g for 15 min, at 4 °C. Soluble protein content was determined according to Bradford (1976) and using a Total Protein Kit, Micro (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

Chlorophyll content

Leaf contents of chlorophyll *a* and *b* and anthocyanins were determined by homogenising tissues in cold acetone – Tris (80:20 v/v; pH= 7.8). The absorbance was measured with a Beckman DV68 spectrometer at 537; 647, and 663 nm. Chlorophyll and anthocyanin contents were calculated according to Sims and Gamon (2002).

Photosynthetic efficiency

Chlorophyll fluorescence was monitored using a Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments Ltd, England-UK). For assessing fluorescence parameters, plants were dark-adapted for 30 min at 22 ± 2 °C. Then, Photosystem II fluorescence was monitored by illuminating leaves with a peak wavelength 650nm and a saturating light intensity of 3000 µmol m⁻² s⁻¹. Chlorophyll basal fluorescence (F_0), variable fluorescence (F_v), maximum fluorescence (F_m) and the ratio (F_v/F_m) were analysed (Vieira Santos et al. 2001).

Membrane permeability determination by electrolyte and solute leakage methods

Similar leaf segments were incubated in 5 mL of deionized water at 25 °C on a rotary shaker (85 rpm). Electrical conductivities of the bathing solution were determined after 24 h incubation (L_t) and after autoclaving (L_0) and electrolyte leakage (L_t/L_0) calculated (Vieira Santos et al. 2001). Similarly, solute leakage was determined in the same bathing solution by ultraviolet-absorbing substances (Vieira Santos et al. 2001) and the relative leakage ratio (RLR) was calculated as $RLR=(A_{280}/A'_{280})$ and expressed as a percentage.

Statistical analyses

Variations among the measured growth parameters and among determined values for each physiological parameter of the micropropagated shoots were analysed. One-way ANOVA was used for data that were normally distributed, while Kruskal-Wallis one Way ANOVA was used otherwise (SigmaStat for Windows Version 3.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois).

II.3.3 Results

Micropropagation studies

One month after inoculation, cuttings survival rates ranged across all conditions from 20% to 35%. These values were considered satisfactory, as they reflected the optimum trade-off between infection and disinfection-induced death of the explants. The highest sprouting rates were obtained on explants initiated on OMG medium (88%), followed by OM (59%) while in the other media sprouting rates were lower than 15%.

During the whole experiment, shoots growing on OMG medium always had dark green leaves (no chlorosis was observed) without abscission (Figure II.3.1–B,G). These shoots had high growth rates (e.g. abundant sprouting and new leaves) (Figure II.3.1–B), allowing the multiplication of good quality shoots at large scale. Contrarily, in the other three media experiments, shoot response was deficient. Shoots growing on OM medium frequently exhibited abnormal symptoms that aggravated with time: leaf veins remained green while the interveinal tissues became chlorotic (light green to yellow); older leaves often turned necrotic with eventual decay (Figure II.3.1–A,G). With subsequent subcultures, OM-grown shoots showed thin stems and often reduced growth (e.g. few new axillary shoots and leaves), making this medium unsuitable for large-scale shoot multiplication (Figure II.3.1–A). OMG₄- and OMG₁₀-grown shoots revealed more severe senescence symptoms such as abundant chlorosis and (or) necrosis, mostly in older leaves, and high rates of leaf abscission (Figure II.3.1–C,D).

When OM-, OMG-, OMG₄- and OMG₁₀-grown shoots, were compared, significant differences ($P < 0.05$) in some of the growth parameters measured were observed (Table II.3.1). OMG-grown had higher rates of elongation (2.23 cm.month⁻¹) than shoots grown on OM (1.37 cm.month⁻¹) or on OMG₄ and OMG₁₀ (in these media shoots did not elongate) (Table II.3.1; Figure II.3.1–A,D). Also, the number of new leaves and new nodes was, in general, higher in OMG-grown shoots (Table II.3.1), while in other the media few or no leaves were newly formed. Leaf abscission was present, mostly occurring in the oldest leaves of OMG₄- and OMG₁₀-grown shoots, while leaf necrosis and decay in OMG-grown shoots were rare (Table II.3.1). Although not statistically different, the number of new axillary shoots formed per explant, was always higher in OMG shoots (higher proliferation rate) than in OM shoots. The other media did not induce new axillary shoots (Table II.3.1). Therefore, with OMG medium, a large number of shoots could be

propagated and (or) maintained in stock for both germplasm preservation and plant regeneration (Figures II.3.1-F).

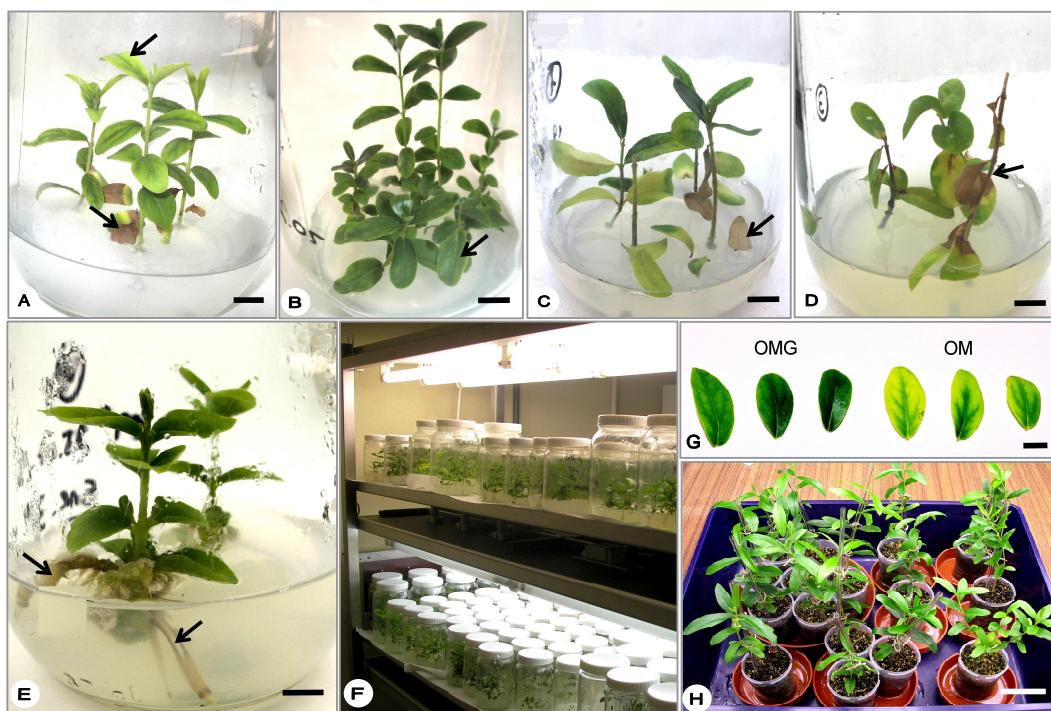


Figure II.3.1 – Micropropagation of *Olea maderensis*. Shoots on elongation-proliferation stage on the following media, supplemented with 9.12 μ M of zeatin: (A) OM (arrows: leaf interveinal chlorosis and necrotic leaf, bar = 1.0 cm); (B) OMG (arrow: healthy dark green leaf, bar = 1.0 cm); (C) OMG₄ (arrow: necrotic and decayed leaf, bar = 1.0 cm) and (D) OMG₁₀ (arrow: necrotic stem, bar = 1.0 cm). (E) Rooted shoots after 30 days in rooting medium ($\frac{1}{2}$ OMG_{WH}) (arrows: roots, bar = 1.0 cm). (F) Stock of shoots growing on OMG medium. (G) Leaves of in vitro shoots: left side- dark green OMG-grown leaves; right side- interveinal chlorotic OM-grown leaves (bar = 1.0 cm). (H) Acclimatized 10-week-old plants (from OMG-grown shoots) on pots with peat:vermiculite (1:3) (bar = 10.0 cm).

With time a yellow-green compact callus often developed at the base of OM-, OMG- and OMG₄-grown shoots. Contrarily, OMG₁₀-grown shoots did not form calluses and their stems underwent browning and (or) necrosis (Table II.3.1).

Table II.3.1 - Shoot proliferation experiments of *O. maderensis* on OM, OMG, OMG₄ and OMG₁₀ media.

Culture Media	Shoot elongation (cm)	No. of new leaves	No. of necrotic leaves	No. of new nodes	No. of new axillary shoots (proliferation rate)	Callus (Ø cm)	Leaf chlorosis
OM	1.37±0.28a	2.21±1.70ac	4.21±0.54b	3.14±0.73a	0.86±0.33ac	0.54±0.03a	+++
OMG	2.23±0.45a	6.29±1.77a	0.71±0.24a	4.07±0.81a	2.14±0.33a	0.53±0.03a	+
OMG ₄	0.0b	-3.64±0.41bc	3.50±0.40b	0.0b	0.0bc	0.51±0.02a	++++
OMG ₁₀	0.0b	-4.79±0.39b	4.79±0.39b	0.0b	0.0bc	Browning*	+++++

Note: Values are means ± SE (*n* = 14 shoots) obtained over 5 weeks of growth (from three independent experiments).

Leaf was evaluated based on a semiquantitative scale (+, no chlorosis, to +++++, highly chlorotic leaves). For each parameter (column), means followed by the same letter are not significantly different (*P* < 0.05) among the media.

* OMG₁₀-grown shoots did not form calluses and their stems underwent browning and (or) necrosis.

The highest rooting rates (70-87%, Table II.3.2) were obtained for ½ OMG medium compared with ½ OM (13%). In both media, the first roots appeared after 4 weeks, and, on average, after 2 months, each shoot produced two to eight roots, mostly on ½ OMG (Figure II.3.1–E). Plantlets obtained in ½ OMG had hard stems, dark-green leaves, and appeared healthy and morphologically identical, while those formed on ½ OM displayed leaf chlorosis and often had thin stems. Therefore, only the plantlets, obtained from OMG experiments, were used on acclimatization procedures. Plants were acclimatized with 97% of plant survival (after 3 months) to greenhouse conditions (Figure II.3.1–H).

Table II.3.2 – Rooting studies in *O. maderensis* using ½ OM and ½ OMG.

Culture Media	Rooting conditions and PGR (µM)	Number of explants	Number of rooted plantlets	Rooting (%)
½ OM	3.22 µM NAA (5 days dark) and transfer to ½ OM _{WH}	15	2	13
½ OMG	3.22 µM NAA (5 days dark) and transfer to ½ OMG _{WH}	23	20	87
		30	21	70
		21	18	86

Note: PGR - plant growth regulators; WH – without hormones; NAA – α-naphthalene acetic acid.

Physiological studies

Water content and osmolality

In vitro leaves had, on average, higher water content values (75.8% for OM and 72.0% for OMG) than the mother plant (54.8%) (Figure II.3.2). On the other hand, tissue osmolality of in vitro leaves was not different from that of field leaves (Figure II.3.3).

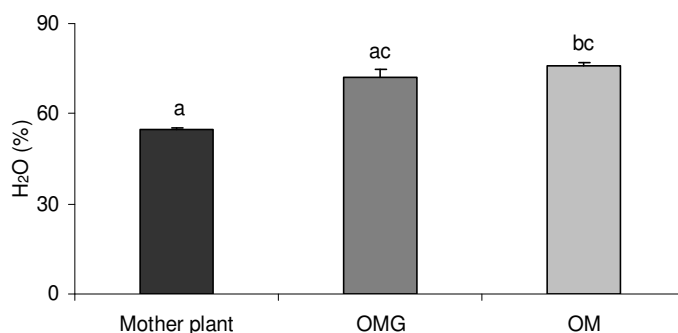


Figure II.3.2 – Water content of *Olea maderensis* leaves from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

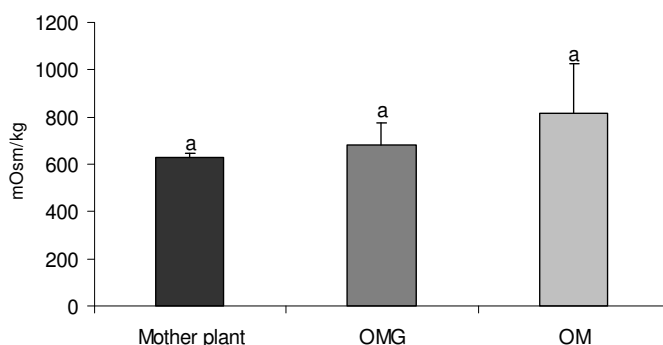


Figure II.3.3 – Osmolality of *Olea maderensis* leaves from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Mineral composition

Comparative analysis of mineral composition of in vitro leaves grown on OM or OMG media showed that P, Na, K, B and Cu contents did not undergo significant changes when compared with values obtained for mother plant. However, the content of Mg, Ca, Zn, Fe and Mn in leaves from OM and OMG treatments did differ significantly ($P < 0.05$) from the contents in leaves of mother plant. The levels of Mg, Fe and Mn significantly increased in in vitro leaves, with higher values for OMG-grown shoots (Figure II.3.4–A, B). Calcium showed a downward tendency in OMG-grown leaves when compared with levels found in mother plant. On the other hand, Zn levels increased in in vitro leaves compared with leaves in mother plant.

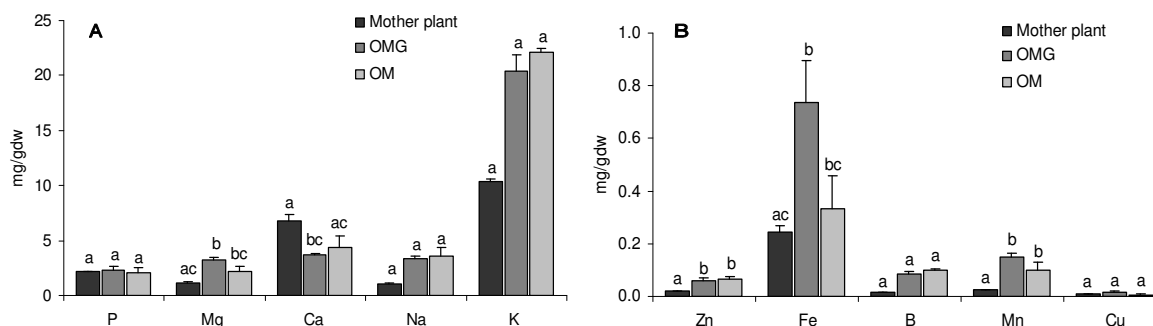


Figure II.3.4 – A, B – Contents of P, Mg, Ca; Na, K, Zn, Fe, B, Mn and Cu ($\text{mg} \cdot (\text{g dw})^{-1}$) in *Olea maderensis* leaves, from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Soluble protein content

Soluble protein contents (Figure II.3.5) increased ($P < 0.05$) in in vitro leaves when compared with values obtained from mother plant, although no significant differences were found between OM and OMG leaves.

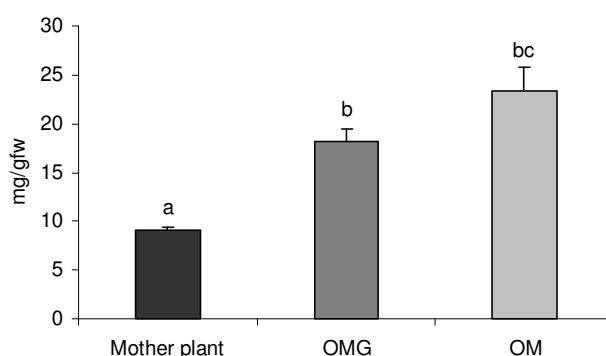


Figure II.3.5 – Soluble protein concentrations in *Olea maderensis* leaves, from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Chlorophyll content

Data obtained from chlorophyll content analyses are reported in Figure II.3.6. Chlorophyll *a* (chl *a*) contents of in vitro leaves (from both OM and OMG media) are not significantly different from those in leaves of the mother plant. However, leaves grown on OMG medium had a significant ($P < 0.05$) increase of chl *a* level (0.62 mg/gfw) compared with those grown on OM medium (0.52 mg/gfw). Chlorophyll *b* (chl *b*) content increased significantly ($P < 0.05$) in OMG-grown leaves (0.70 mg/gfw) when compared with values from leaves of both mother plant (0.27 mg/gfw) and OM-grown shoots (0.24 mg/gfw). Total chlorophyll (chl *t*) also increased significantly ($P < 0.05$) in leaves grown on OMG

medium. Anthocyanin content decreased ($P < 0.05$) in in vitro leaves grown on both media when compared with contents in mother plant.

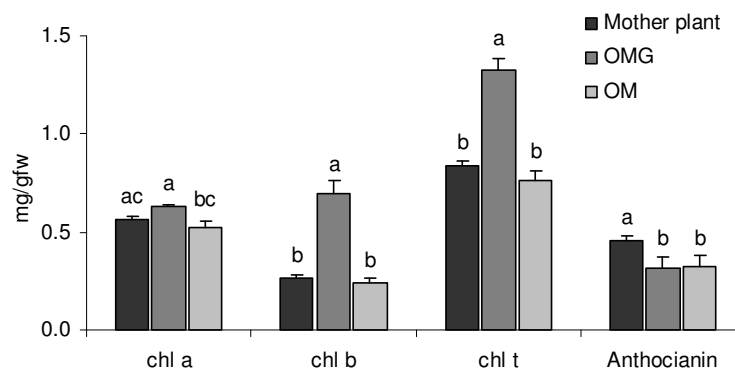


Figure II.3.6 – Concentrations of the chlorophyll *a* (chl *a*), chlorophyll *b* (chl *b*), total chlorophyll (chl *t*) and anthocyanin in *Olea maderensis* leaves from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 6$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Photosynthetic efficiency

In the analysis of chlorophyll fluorescence parameters (Figure II.3.7–A,B), basal fluorescence (F_0) increased significantly ($P < 0.05$) in in vitro leaves (in both culture media) compared with values in mother plant. On the other hand, F_m and F_v decreased ($P < 0.05$) compared with values in mother plant; this decrease was more accentuated in leaves of shoots grown on OM medium. The F_v/F_m ratio was, on average, close to 0.8 in all conditions, although slightly lower ($P < 0.05$) in OMG-grown leaves.

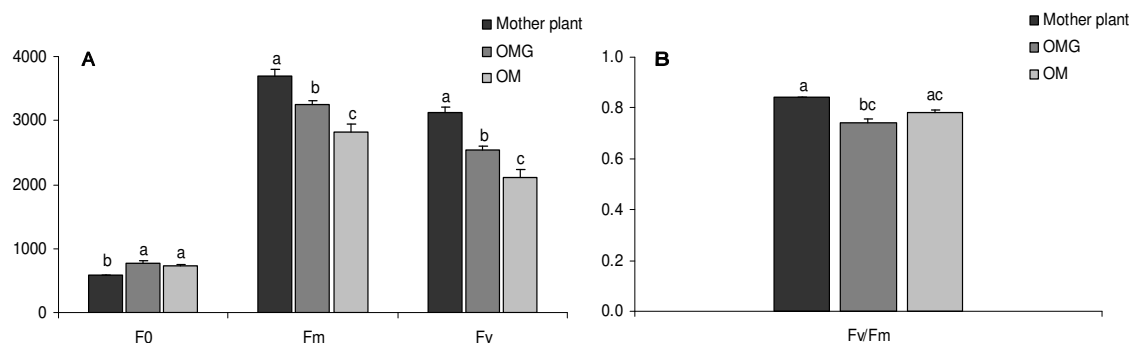


Figure II.3.7 – A, B – Fluorescence parameters in *Olea maderensis* leaves, from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 6$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$. F_0 – basal chlorophyll fluorescence; F_m – maximal chlorophyll fluorescence; F_v – variable component of chlorophyll ($F_v = F_m - F_0$) and ratio F_v/F_m .

Membrane permeability

Electrolyte leakage (L_t/L_0) and relative leakage ratio (RLR) did not vary among shoots cultivated on OM and OMG media and there were no significant difference between values obtained from in vitro leaves and those obtained from mother plant (Figure II.3.8).

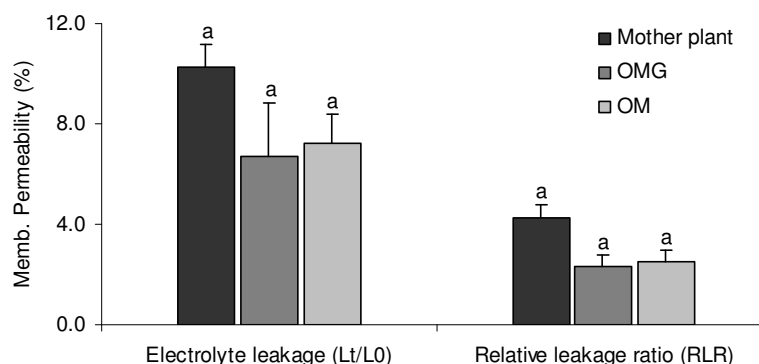


Figure II.3.8 - Membrane permeability (solute leakage) expressed as electrolyte leakage (L_t/L_0 , expressed as percentage) and as relative leakage ratio - RLR ($RLR = A_{280}/A'_{280}$, expressed as percentage) in *Olea maderensis* leaves, from mother plant and from shoots grown in OMG and OM media (1-year-old subcultures). Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

II.3.4 Discussion

The work presented here reports comparative studies between OM and OM basal modifications (OMG, OMG_4 and OMG_{10}) to improve large-scale micropropagation of *O. maderensis*. Results show that the mineral composition of the media strongly influences tissue culture response of *O. maderensis*, with evident differences in the shoot growth pattern.

Previous research (for a review see Ramage and Williams 2002) has shown that the mineral nutrient content of tissue cultures affects morphogenesis. Therefore, ensuring the adequacy of the culture medium is crucial to the development of protocols for large-scale plant production by micropropagation. The mineral composition of the olive medium (OM) was designed for olive micropropagation and OM is successfully used (at full or half strength) in many *O. europaea* cultivars (Cozza et al. 1997, Zacchini and De Agazio 2004, Mencuccini 2003, Peixe et al. 2007). Results from this study indicate that OM medium was not suitable for routine large-scale micropropagation of *O. maderensis*, as the shoots showed leaf interveinal chlorosis and decay. This interveinal chlorosis is often

symptomatic of a deficiency in Fe, Mg and (or) Mn (Clatterbuck 1999). Therefore, adjustments to the OM medium were carried to determine the concentrations of Fe, Mg and Mn that were most suitable for *O. maderensis* micropropagation (these three elements are essential to many functions, including chlorophyll synthesis and photosynthesis).

OM is suitable for many olive species and genotypes, but few studies have varied nutrient concentrations of this medium to improve micropropagation (Rama and Pontikis 1990). Ramage and Williams (2002) highlight the necessity of using different formulations during the different micropropagation stages, although they recognize that, in general, this is not done. Also, optimum requirements vary widely among genotypes, and as emphasized by Williams (1993), predicting the mineral requirements of untested species is impossible. This was indeed the case when the OM medium formulation was used without previous testing on *O. maderensis*. Pinto et al. (2008a, 2008b) stated that designing new media formulations are often empirical. Morphological and physiological data may help to evaluate mineral unbalances and adjust existing formulations.

The results reported here are a good example of how chlorotic symptoms of OM-grown *O. maderensis* shoots may be overcome by increasing the levels of some OM nutrient. Nonetheless, nutrients levels (Fe, Mg, and Mn) should be increased gradually, as high concentrations may lead to shoots growth inhibition and (or) senescence, as occurred in OMG₄- and OMG₁₀-grown shoots in the present study. These negative outcomes may be related with nutrient stress or even toxicity. For example, Sarkar et al. (2004) reported that in micropropagated potato excess of Mn supply resulted in stem necrosis with rooting and growth inhibition. Also Fe may cause growth inhibition, necrotic spots and leaf decay (Lucassen et al. 2000).

Shoot growth showed strong apical dominance in OM and OMG experiments, an aspect previously described for this (Brito et al. 2007) and other *Olea* species (Zacchini and De Agazio 2004). Our proliferation rates for OMG (2.14 ± 0.33 new axillary shoots) are in agreement with values obtained by Grigoriadou et al. (2002) and Peixe et al. (2007), even considering that they used the number of newly formed nodes instead of newly formed shoots.

The occurrence of basal callus was reported for the olive cultivar. Nebbiara, and its negative correlation with shooting and (or) rooting has been discussed (Zacchini and De Agazio 2004). In our shoot proliferation experiments, the effect of media on callus production was minimal, except for the OMG₁₀ medium, in which stem browning and the absence of calluses suggest nutrient toxicity.

Because the OMG-grown plantlets had higher rooting rates and were of greater quality than the OM-grown plantlets, we used only OMG-grown plants in acclimatization procedures and achieved a high rate of success (97%).

The physiology of in vitro shoots has been the subject of several investigations, mostly dealing with the effects of stress conditions (Santos and Caldeira 1999, Vieira Santos et al. 2001, Brito et al. 2003, Oliveira et al. 2008). As the nutrient imbalances in the culture medium can be stressful, physiological parameters were used to quantify the performance of *O. maderensis* shoots growing on the two media that allowed plant regeneration (OMG and, less efficiently, OM).

Water content, osmolality and membrane permeability, are often used to measure plant responses to stress (Vieira Santos et al. 2001, Oliveira et al. 2008). These parameters did not differ statistically between OMG- and OM-grown shoots, suggesting no major stress conditions in either media.

Soluble protein content of in vitro shoots increased compared with those in mother plant. Similarly, Premkumar et al. (2001) showed higher soluble protein contents in OM-micropropagated olives than in ex vitro ones. Moreover, in vitro leaves presented a 38 kDa protein (a molecular weight that is higher than that of the Rubisco large subunit), whose role is unknown (Premkumar et al. 2001). Curiously other species (avocado, strawberry and oak) showed decreases of soluble protein content when grown in vitro (Premkumar et al. 2001). The reason for this protein increase in in vitro *O. maderensis* leaves is currently under study.

The mineral composition analysis of in vitro leaves showed, as expected, that Mg, Fe and Mn levels, significantly increased in OMG-grown shoots. Doubling the concentrations of three of the nutrients used in the OM medium had a significant effect on the growth of shoots as well as on photosynthesis, as the results from chlorophyll content and photosynthetic efficiency proved. Also, calcium showed an unexpected downward tendency in OMG in vitro leaves when compared with calcium levels in mother plant, despite the fact that OM is calcium rich (Lucchesini and Mensuali-Sodi 2004). Therefore, putative competition with other cations (e.g. Mg) should be considered. Moreover, OMG-grown plants had excellent survival rates, suggesting that this decrease did not negatively affect these plants.

Chlorosis, a common symptom of stressed plants, was observed in OM-grown shoots reflecting a degradation of chlorophyll and (or) deficiency in chlorophyll synthesis and, consequently, deficiencies in the photosynthetic process (Godde 1999). The absence of chlorosis, together with the increase of chlorophyll content (chl *a* and chl *b*), in OMG-grown shoots provides evidence that doubling Fe, Mg and Mn was effective in protecting

and (or) restoring the photosynthetic process. The decrease of anthocyanin content in in vitro leaves may be explained by the reduced luminosity, lower stress and lower differentiation and age compared with field leaves. OMG-grown leaves also showed better photosynthetic efficiency than OM-grown leaves. These results correlate with chlorophyll content data. The F_v/F_m ratios are near 0.8, which is the optimum value and therefore indicative of healthy plants (Fracheboud 2001). The same F_v/F_m ratios have been found for other in vitro cultures (Santos et al. 2005, Oliveira et al. 2008), even considering that these in vitro cultures favour heterotrophic conditions.

II.3.5 Conclusions

Micropropagation is presently the only efficient method of propagating the endangered species *O. maderensis*. Although OM is the most widely used medium for plant micropropagation within the *Olea* genus, basal modifications must often be carried out for specific needs of one species or cultivar to optimize the process. *Olea maderensis*'s high requirements for Fe, Mg and Mn may be due to the fact that it is an endemic species from the volcanic Madeira Archipelago. Doubling these elements (OMG) overcame the problems observed in OM medium. Furthermore, we demonstrate the validity of using physiological parameters for assessing improvements to culture media. The OMG medium is already being used for long-term shoot cultures and routine micropropagation of *O. maderensis*, within a germplasm preservation (Figure II.3.1–F) and breeding program of this species, which is being used in strategies to fight desertification.

Acknowledgments

The authors thank Direcção Regional de Florestas and Secretaria Regional da Educação from Madeira Autonomous Region and Porto Santo Town Hall. Thanks are due to Armando Costa, Tina Lopes, Ana Sofia Gabriel for laboratory assistance and to Glória Pinto and Sónia Silva for reviewing this manuscript. The FCT project (FCT – PNAT/1999/AGR/15011/99) supported this work.

References

- Albarède F. (2007). *Geochemistry: An Introduction*. Cambridge University Press, New York.
- Azevedo H., Pinto G., Santos C. (2005). Cadmium effects in sunflower: nutrient imbalances in leaves and calluses. *Journal of Plant Nutrition* 28(12): 2233-2241.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brassard N., Richer C., Tousignant D., Rioux J.A. (2003). Multiplication végétative de l'*Acer saccharum*: contribution à la micropropagation. *Canadian Journal of Forest Research*. 33(4): 682-690. doi:10.1139/x02-192.
- Briccoli Bati, C., Godino, G., Monardo, D., Nuzzo, V. (2006). Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars 'Carolea' and 'Nocellara Etnea'. *Scientia Horticulturae* 109: 173-182.
- Brito G., Costa A., Fonseca H., Santos C. (2003). Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* in vitro shoots to osmotic stress. *Scientia Horticulturae* 97: 411-417.
- Brito G., Jardim R., Coelho C., Santos C. (2007). Micropropagation of a native species of Porto Santo Island as a strategy to combat desertification: wild olive as example. *Silva Lusitana* 15(2): 229-247.
- Brito G., Loureiro J., Lopes T., Rodriguez E., Santos C. (2008). Genetic characterization of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:657-664. Doi: 10.1007/s10722-007-9268-8.
- Clatterbuck W.K. (1999). Nutrient deficiencies in trees. Agricultural Extension Service. University of Tennessee. SP 534-15M-3/99. Accessed 24 April 2008 in: <http://www.utextension.utk.edu/publications/spfiles/SP534.pdf>.
- Cozza R., Turco D., Bati C., Bitonti M.B. (1997). Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 51: 215-223.
- De la Guardia M.D., Alcántara E. (2002). Bicarbonate and low iron level increase root to total plant weight ratio in olive and peach rootstock. *Journal of Plant Nutrition* 25(5): 1021-1032.

- Fracheboud Y. (2001). Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. Presentation from the Institute of Plant Sciences ETH, Universitätstrasse 2, CH- 8092 Zürich. Accessed 15 March 2008 in: <http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>.
- Godde D. (1999). Adaptations of the photosynthetic apparatus to stress conditions. In: Plant Responses to Environmental Stress. Lerner H.R. (ed.). CRC Press, ISBN 0824700449, 9780824700447. pp. 449-464. Accessed 15 March 2008 in: <http://books.google.com>.
- Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P. (2002). In vitro propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71: 47–54.
- Kothari S.L., Agarwal K., Kumar S. (2004). Inorganic nutrient manipulation for highly improved in vitro plant regeneration in finger millet – *Eleusine Coracana* (L.) Gaertn. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 40: 515-519.
- Lucassen E., Smolders A., Roelofs J. (2000). Increased groundwater levels cause iron toxicity in *Glyceria fluitans* (L.). Aquatic Botany 66: 321-327.
- Lucchesini M., Mensuali-Sodi A. (2004). Influence of medium composition and vessel ventilation on in vitro propagation of *Phillyrea latifolia* L. Scientia Horticulturae 100: 117-125.
- Mencuccini M. (2003). Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Scientia Horticulturae 97: 129-139.
- Naydenov K., Tremblay A., Bergeron Y., Goudiaby V. (2006). Influence du charbon actif sur la croissance primaire des plantules de pin gris. Canadian Journal of Forest Research 36(3): 761-767.
- Oliveira H., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M.A., Santos C. (2008). Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: Emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses. Environmental and Experimental Botany 65: 1-10.
- Olmos E., Hernandez J.A., Sevilla F., Hellín E. (1994). Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. Journal of Plant Physiology 114: 594-598.
- Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., and Macedo, E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. Scientia Horticulturae 113: 1-7.

- Pinto G., Park Y.-S., Silva S., Neves L., Araújo C., Santos C. (2008a). Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95: 69-78.
- Pinto G., Silva S., Park Y.-S., Neves L., Araújo C., Santos C. (2008b). Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95: 79-88.
- Premkumar A., Mercado J.A., Quesada M.A. (2001). Effects of in vitro tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158: 835-840.
- Rama P., Pontikis C.A. (1990). In vitro propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) 'Kalamon'. *Journal of Horticultural Science* 65(3): 347-353.
- Ramage C.M., Williams R.R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 38: 116–124.
- Roussos P.A., Pontikis C.A. (2002). In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation* 37: 295–304.
- Rugini E. (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24:123-134.
- Santos C., Caldeira G. (1999). Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl. I. Growth rate and osmotic regulation in intact plants and calli. *Journal of Plant Physiology* 155: 769-777.
- Santos C., Brito G., Pinto G., Fonseca H. (2003). In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *madeirensis*. *Scientia Horticulturae* 97: 83-87.
- Santos C., Fragoeiro S., Phillips A. (2005). Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an in vitro approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae* 103(2): 187-198.
- Sarkar D., Pandey S.K., Sud K.C., Chanemougasoundharam A. (2004). In vitro characterization of manganese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science* 167: 977-986.
- Sims D.A., Gamon J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81: 337-354.
- Stenvall N., Haapala T., Aarlahti S., Pulkkinen P. (2005). The effect of soil temperature and light on sprouting and rooting of root cuttings of hybrid aspen clones. *Canadian Journal of Forest Research* 35(11): 2671-2678.

- Vieira Santos C., Campos A., Azevedo H., Caldeira G. (2001). In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 52: 351-360.
- Williams R.R. (1993). Mineral nutrition in vitro – a mechanistic approach. *Australian Journal of Botany* 41: 237–251.
- Zacchini M., De Agazio M. (2004). Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum* 48(4): 589-592.

Capítulo II.4

Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers

Avaliação da estabilidade genética de duas oliveiras bravas micropropagadas utilizando citometria de fluxo e marcadores moleculares

Chapter submitted as an original paper to a SCI journal:

Brito G., Lopes T., Loureiro J., Rodriguez E., Santos C. (2009). Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. *Biologia Plantarum (revisions required)*.

Abstract

Micropropagated plants from two wild olive species, *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco and *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot. were screened for genetic stability. For *O. maderensis*, bud-induction was achieved using OMG medium with 3% sucrose, and supplemented with zeatin for shoot elongation-propagation. For rooting, shoots were grown on ½ OMG with NAA and 2% sucrose and then transferred to the same medium without growth regulators. *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, was grown on OM medium with 3% sucrose, and then shoots were transferred to the same medium with zeatin. Rooting was optimal after a hormonal shock (IBA 100 µM) and subsequent transfer to ½ OM without growth regulators. In both species, micropropagated plants looked normal and morphologically identical to the mother plants and acclimatization was successful. Genetic variability was assessed at several stages of the micropropagation process using flow cytometry and nuclear microsatellites (SSR). No major changes in ploidy level are found among micropropagated plants, though small deviations (up to 9%; putatively due to negative effects of cytosolic compounds on propidium iodide staining) between these and field plants are observed. In SSRs stability analyses, ten SSR markers were able to distinguish between genotypes. No mutations were found at the SSR loci among the mother plants and micropropagated plants, for both species, demonstrating genetic uniformity through the process. These results, together with the high rates of plant propagation confirm that the reported systems are suitable for large scale micropropagation of these two wild olive species with no/minimal somaclonal variation.

Keywords: in vitro culture; *Olea* sp.; ploidy level; somaclonal variation; SSR.

II.4.1 Introduction

The genus *Olea* includes ca. 30 extant taxa distributed in Europe, Asia, Africa and Oceania. Olive tree (*Olea europaea* L.) is well spread along the Mediterranean coast, and comprises several economically important cultivars and wild genotypes. In general, these trees have a wide range of adaptability, tolerating moderate unfavourable environmental conditions, such as high summer temperatures and drought, and presenting good adaptation to different edaphic situations and a long life (Zacchini and De Agazio 2004).

In oceanic islands like the Madeira Archipelago and Canary Islands, the original and highly endemic natural vegetation contains elements of sub-tropical tertiary vegetation (including wild olive genotypes) with the forest communities representing its most impressive vegetation. *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco is part of the forest communities of Madeira Archipelago and is an endemic and endangered species whose few surviving individuals occur in nutrient deficient rocky ground under dry/semi-arid conditions (such as in Porto Santo Island) in almost inaccessible rifts. In an attempt to fight the desertification process that for long threatens Porto Santo Island ecosystem, in the early 20th century, trees of *O. europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot. (from now on referred as *O. var. sylvestris*), a characteristic species of Mediterranean natural ecosystems, were introduced in some slopes of the island (Brito et al. 2008). Owing to their recent history and/or protection status, adult individuals of these wild olive species represent interesting material for germplasm preservation. However, the propagation of these species by traditional methods (e.g. own-rooted cuttings) has been rather inefficient and enfeebled the forestation programs performed so far. As in other endangered species (e.g. Malá and Bylinský 2004, Zacchini and De Agazio 2004), micropropagation programs appear as efficient, rapid and convenient strategies to propagate and preserve endangered local cultivars or native plants.

Micropropagation protocols have already been established for commercial cultivars of *O. europaea* using different explant sources (e.g. Rugini 1984, Canas et al. 1987, Canas and Benbadis 1988, Revilla et al. 1996, Roussos and Pontikis 2002, García et al. 2002, Grigoriadou et al. 2002, Brito et al. 2003, Santos et al. 2003, Zachinni and De Agazio 2004). Olive medium (OM) (Rugini 1984) is widely used to micropropagate commercial cultivars but no data is available for the species *O. var. sylvestris*. Moreover, Brito and Santos (2009) described that the wild species *O. maderensis* required an increase of Fe, Mg and Mn in contents of OM basal composition (OMG medium) for an optimal micropropagation process.

Despite of the usefulness of micropropagation, one of its major problems is the possible occurrence of genetic variability among the sub-clones of parental lines (inherent to the in vitro processes), and thus, a successful true-to-type propagation of the plant material should also be guaranteed. Among the many methods that may be employed to assess somaclonal variation in plants, both flow cytometry (FCM) and microsatellite markers or SSRs (simple sequence repeats) allow a cheap, rapid and reliable analysis of genetic variability at different genomic levels. FCM is a powerful technique that has been already successfully used to access clonal fidelity in several woody species (e.g. Conde et al. 2004, Pinto et al. 2004, Loureiro et al. 2005, 2007a). Also, SSRs have become one of the most successful markers in plant breeding, being widely used for cultivar fingerprinting, paternity testing and genome mapping (e.g. Rallo et al. 2003, Brito et al. 2008). In olive, due to their desirable properties (transferability, high level of polymorphism and information content, and co-dominance), SSRs became the markers of choice for cultivar identification (e.g. Rallo et al. 2000). For assessing in vitro somaclonal variation, SSRs were previously used with success in some woody species (e.g. Rahman and Rajora 2001, Wilhelm et al. 2005, Lopes et al. 2006, Burg et al. 2007), including olive (Lopes et al. 2009).

The aim of this work was to assess genetic stability in micropropagated plants of the two wild olive species, *O. maderensis* and *O. var. sylvestris*, within a breeding program of the *Olea* genus in the Madeira Archipelago. We also describe two complete micropropagation protocols (up to open greenhouse) of *O. var. sylvestris* (first report) and of *O. maderensis* (Brito et al. 2009). The potential true-to-typeness of these protocols was evaluated using FCM and SSRs in micropropagated plants. Furthermore, the genetic analysis of these species provides a basis for the conservation and improvement of their germplasm.

II.4.2 Materials and methods

Micropropagation protocols

Plant material and shoot proliferation

Cuttings were collected in winter from adult field trees (> 30 years old) belonging to two wild olive species, *Olea maderensis* and *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* from Madeira Archipelago. Leaves were removed and treated according to Brito and Santos (2009).

Disinfected cuttings comprising one or two axillary bud(s) were placed in groups of four to five explants per glass vessels (total of 20 glass vessels for each species) on the following induction media: a) olive medium (OM) (Rugini 1984) and b) OMG medium (Brito et al. 2009). Both media were supplemented with 3% (w/v) sucrose, 0.7% (w/v) agar and pH adjusted to 5.8. Cultures were incubated for one month in a growth chamber (Brito et al. 2009). Shoot proliferation-elongation in both species took place in the presence of 9.12 μM of zeatin. Subculturing was performed monthly according to Brito and Santos (2009), and shoots were used as stock material for all experiments.

Due to species responses during induction to the different media, shoot proliferation-elongation experiments were carried out using only OM for *O. var. sylvestris* and OMG for *O. maderensis*. These experiments lasted for 5 weeks, under the same culture conditions used for stock material. To assess micropropagation efficiency of these two species, three experiments were conducted in which the following growth parameters were measured on 14 shoots of each species: shoot elongation, number of new leaves, number of new nodes, proliferation rate (as defined by Brito et al. 2009), and callus diameter.

Rooting experiments

Apical segments with two or three nodes were selected, and cultivated on rooting media. According to the available literature on the *Olea* genus (Cozza et al. 1997, Grigoriadou et al. 2002, Mencuccini 2003, Zacchini and De Agazio 2004, OEPP/EPPO 2006, Brito et al. 2007), several rooting strategies were tested in both species (see Table II.4.2 for full details). All media were used at half-strength, supplemented with 2% sucrose and the pH was adjusted to 5.8. All experiments took place at the same growth chamber conditions as those used for stock material. Explants' response to rooting was monitored for 2 months, after which the number of rooted plantlets was recorded and expressed in terms of rooting percentage.

Plant acclimatization

When two to four roots with 5-10 cm in length were developed, in vitro plantlets were transferred to a sterilised mixture of peat:vermiculite (1:3, w/w) watered with $\frac{1}{2}$ OMG (for *O. maderensis*) or $\frac{1}{2}$ OM (for *O. var. sylvestris*) liquid medium (with no sucrose or growth regulators). Plantlets were maintained in vitro for 2 more weeks under the growth chamber conditions described above. After this period, plants were transferred to another growth cabinet in the aforementioned conditions, but with progressive decreasing of relative humidity (up to 70% RH) and with increasing light conditions, until transfer to the field.

Occasionally, 1 g.L⁻¹ Benlate® solution was applied to the plants. Acclimatized plants were then transferred to a greenhouse, and after 3 months they were moved to an open greenhouse in Porto Santo Island, where they remained for 10 months for adaptation to the Island conditions.

Genetic variability assessment

Plant material

To assess variation within clones of the same origin and between these and their mother plants, the following plant material was collected at different stages of the micropropagation process: a) leaves from the field mother plants (collected in winter); b) leaves from in vitro micropropagated plants (1 year of shoot subcultures on elongation-proliferation stage) and c) leaves from greenhouse acclimatized plants (after 3 months of acclimatization).

Flow cytometric analyses

Leaves from the mother plants were collected in the field, maintained in moistened paper and analysed within a maximum period of three days. Leaves from the in vitro and acclimatized plants, were collected and analysed immediately. Estimation of the ploidy level was made following the protocol described in Brito et al. (2008), using *Pisum sativum* cultivar Ctirad as the internal reference standard (2C = 9.09 pg; Doležel et al. 1992). In each sample, propidium iodide fluorescence and scatter properties of at least 5,000 nuclei of both sample and standard were analysed. The DNA index, i.e., the ratio between the mean fluorescence of G₀/G₁ nuclei of sample and standard, was calculated as an indicator of the ploidy level of each sample. For each species, 5 to 15 replicates were performed per stage of the micropropagation process.

SSR analyses

Leaves from the mother plants and from in vitro and acclimatized plants were collected and stored at -80°C. Genomic DNA was extracted from 80 mg of leaves with the DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN™, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were estimated spectrophotometrically and by electrophoresis, using a comparison with a standard MW marker (lambda HindIII, NEB). Ten microsatellites were selected as being the most polymorphic ones available for the genus (Sefc et al. 2000, De la Rosa et al. 2002). SSR analyses were made according to

Brito et al. (2008). For each species, five samples were performed per stage of the micropropagation process.

Statistical analyses

Differences in growth parameters during shoot proliferation between the two species were analysed using a one-way ANOVA on Ranks (SigmaStat for Windows Version 3.1, SPSS Inc., Chicago, Illinois). The same procedure was employed in the analysis of differences in DNA index among the different types of plant material. In both cases, either the Tukey test or the Dunn's methods (in the case of unequal group size) were used for pair-wise comparison.

II.4.3 Results

Micropropagation protocols

In a step-by-step analysis of the micropropagation protocols, *O. var. sylvestris*, explant sprouting was successfully achieved only on OM medium (Figure II.4.1-a), while in *O. maderensis* better results were obtained on OMG medium (Figure II.4.1-b). Therefore, further quantitative analyses concerning micropropagation protocols were performed for *O. var. sylvestris* on OM medium and for *O. maderensis* on OMG, and the different stages of the protocols used are illustrated in Figure II.4.2.

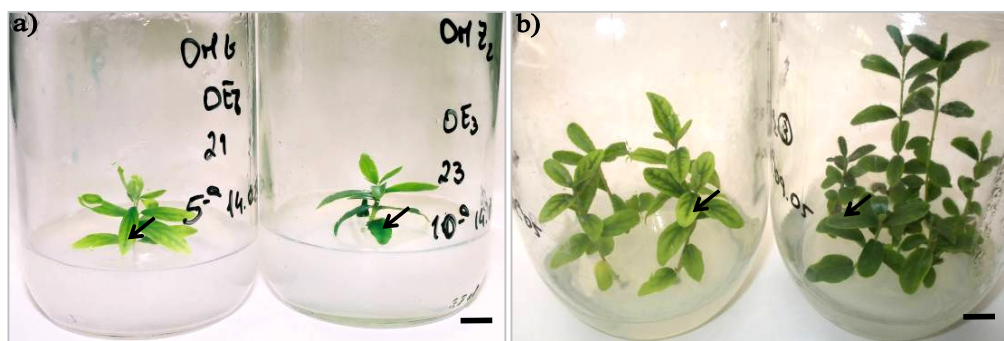


Figure II.4.1 – In vitro culture establishment of two wild olives species on the following media supplemented with 9.12 μM of zeatin: **a)** *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, left glass vessel – OMG (arrow: leaf interveinal chlorosis); right glass vessel – OM (arrow: healthy dark green leaf) (bar = 1.0 cm); **b)** *Olea maderensis*, left glass vessel – OM (arrow: leaf interveinal chlorosis); right glass vessel – OMG (arrow: healthy dark green leaf) (bar = 1.0 cm).

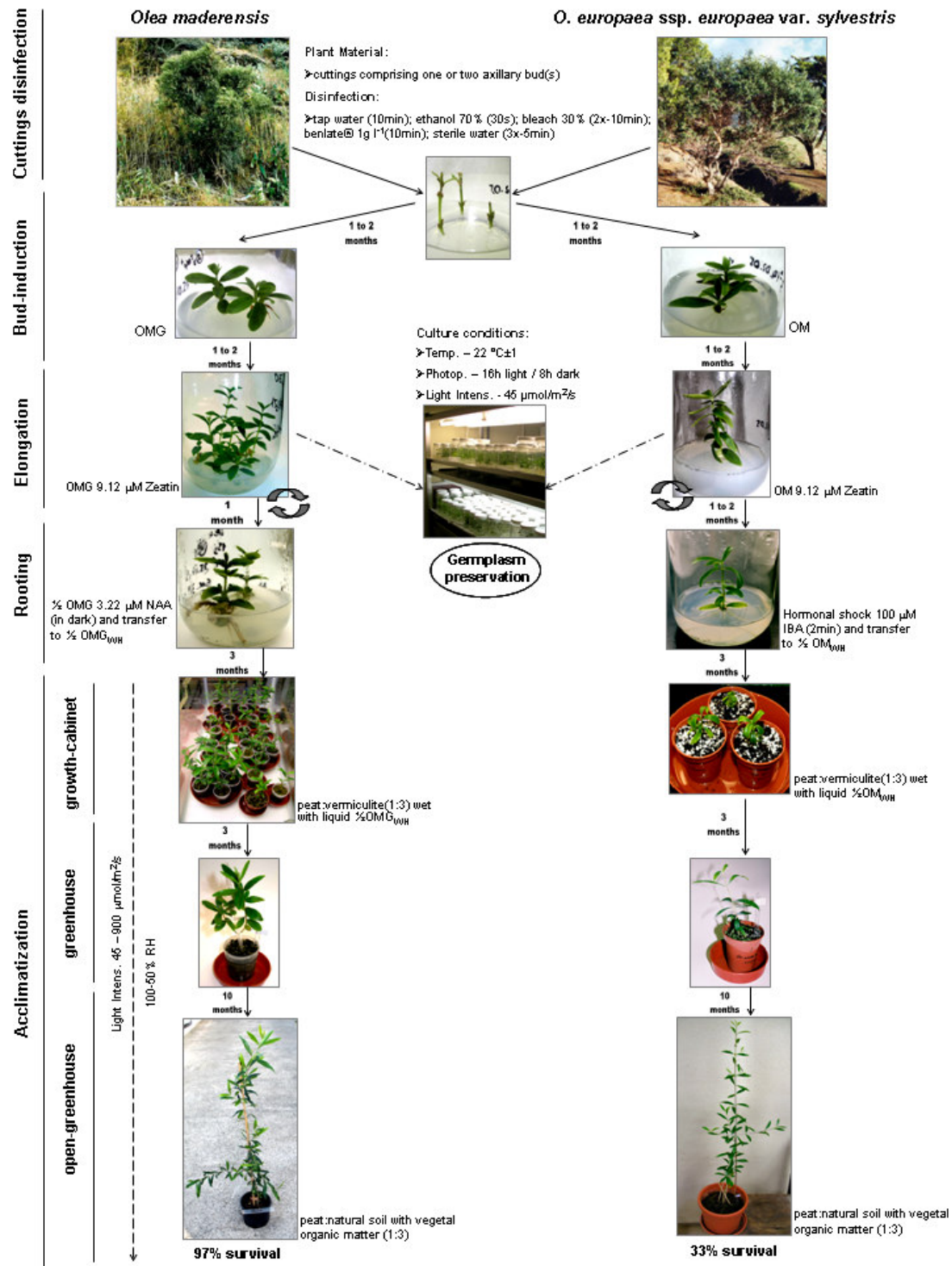


Figure II.4.2 – Micropropagation protocols used in *Olea maderensis* and *Olea europaea ssp. europaea var. sylvestris*. OM - olive medium (Rugini, 1984); OMG – modified OM (Brito et al. 2009); WH – without hormones; HR – relative humidity; IBA – indole butyric acid; NAA – α -naphthalene acetic acid.

Both species presented high apical dominance, which was overcome with the use of basal segments, in particular in *O. maderensis*. In this species, three new shoots were usually obtained in each shoot derived from basal explants (Table II.4.1). In *O. var. sylvestris*, the proliferation rate was low, but the elongation, with the formation of new nodes, allowed shoot multiplication during subcultures (Table II.4.1). In both species it was possible to maintain cultures for long periods - up to three years for *O. var. sylvestris* and up to five years for *O. maderensis*.

Table II.4.1 – Shoot proliferation experiments of *Olea maderensis* and of *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*.

Species	Type of explant	Shoot elongation (cm)	No. of new leaves	No. of new nodes	No. of new shoots (Proliferation rate)	Callus (Ø cm)	Plant regeneration (%)
<i>O. maderensis</i>	Apical	1.21±0.43a	4.00±2.34a	2.71±1.15a	1.29±0.29a	0.53±0.06a	97
	Basal	3.24±0.61b	8.57±2.53b	5.43±0.95b	3.00±0.38b	0.60±0.06a	
<i>O. var. sylvestris</i>	Apical	0.41±0.14	2.57±1.00	1.43±0.48	1.00±0.00	0.74±0.05	33

Note: Values are means ± SE ($n = 14$ shoots) obtained over 5 weeks of growth (from three independent experiments). For each parameter (column), means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Rooting was achieved after 1 month for *O. maderensis* and after 2 months for *O. var. sylvestris*. In the former species 84% of the shoots produced roots after culturing on ½ OMG with 3.22 µM NAA (incubated in the dark), and subsequent transfer to ½ OMG medium without growth regulators (½ OMG_{WH}). Exposure to a 100 µM IBA shock followed by a transfer to ½ OM medium without growth regulators (½ OM_{WH}) led to 14 % and 15 % rooting efficiency, respectively for *O. maderensis* and *O. var. sylvestris* (Table II.4.2).

Plant acclimatization was first initiated in vitro. In general, *O. maderensis* presented excellent acclimatization performance with an average of 97% of plant survival in the greenhouse. By other way, plant survival during acclimatization was of 33% for *O. var. sylvestris* (Table II.4.1; Figure II.4.2). The transfer to an open greenhouse in Porto Santo Island, 3 months later, was a success, as after 10 months all the individuals from both species are healthy.

All these micropropagated plants had green leaves, well developed internodes, and looked morphologically identical (Figure II.4.2), so it was assumed that the protocols used in both species induced no phenotypical variation. Nevertheless, despite apparent

morphologic stability, genetic analyses were performed to confirm true-to-typeness of both protocols.

Table II.4.2 – Rooting experiments performed in *Olea maderensis* and *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*.

Basal culture medium	Rooting conditions and PGR (μ M)	References	Rooting (%)	
			<i>O. maderensis</i>	<i>O. var. sylvestris</i>
½ WPM	12 IBA + 3 NAA	Grigoriadou et al. 2002	0	0
½ MS	5 NAA	Mencuccini 2003	0	0
½ OM	12.3 IBA	Cozza et al. 1997	0	0
½ OM	24.6 IBA	OEPP/EPPO 2006	0	0
½ OM	100 IBA (2min) and transfer to ½ OM _{WH}	Brito et al. 2007	14	15
½ OMG	3.22 NAA (5 days dark) and transfer to ½ OMG _{WH}	Zacchini and De Agazio 2004 Brito et al. 2007	84	0

Note: The rooting conditions were selected according to the available literature for the *Olea* genus (Cozza et al. 1997, Grigoriadou et al. 2002, Mencuccini 2003, Zacchini and De Agazio 2004, OEPP/EPPO 2006, Brito et al. 2007).

PGR – plant growth regulators; OM - Olive Medium (Rugini 1984); OMG – modified OM (Brito et al. 2009); WPM – Woody Plant Medium (McCown and Lloyd 1981); MS – Murashige and Skoog (Murashige and Skoog 1962); (½) half strength of the basal medium; WH – without hormones; IBA – indole butyric acid; NAA – α -naphthalene acetic acid.

Assessment of genetic variability

Flow cytometric analyses

The analysis of isolated and stained nuclei of both olive species using flow cytometry resulted in highly reproducible histograms with well defined G₀/G₁ peaks presenting CV values usually below 3.5 % (see illustrative histograms in Figure II.4.3), ensuring the reliability of the technique.

The analysis of nuclear DNA content of the field plants revealed different ploidy levels in both species, 2n = 4x in *O. maderensis* and 2n = 2x in *O. var. sylvestris*. Genome size estimations indicate 2C = 6.11 ± 0.07 pg for *O. maderensis* and 2C = 3.23 ± 0.02 for *O. var. sylvestris*. The analysis of nuclear DNA content variability among the in vitro and acclimatized plants and the mother plants revealed small, but statistically significant differences in both species (Table II.4.3). While in *O. var. sylvestris* there was a 2.5 % decrease in nuclear DNA amount from the mother plants to the micropropagated material, in *O. maderensis*, only the acclimatized plants presented a statistically significant difference (app. 9%) in nuclear DNA content.

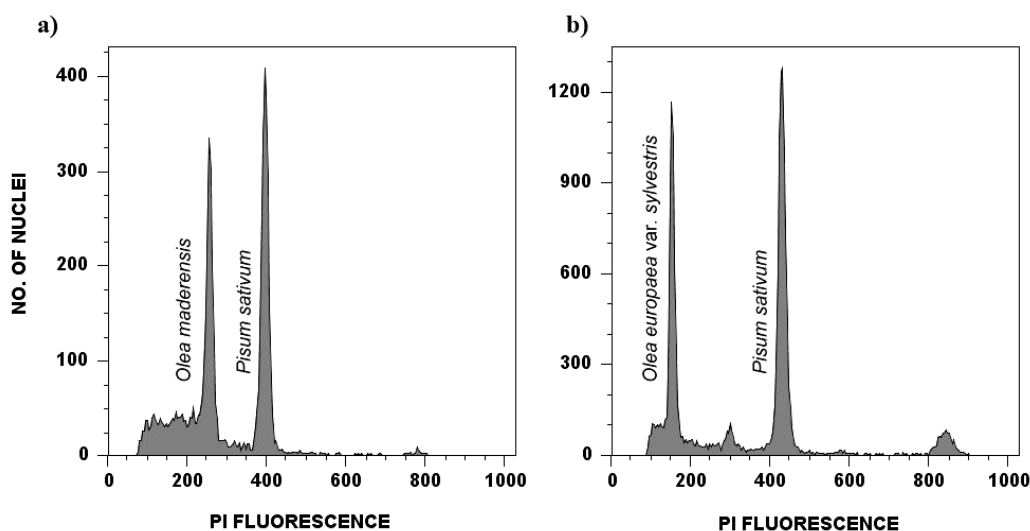


Figure II.4.3 – Histograms of relative fluorescence intensity obtained after simultaneous analysis of nuclei isolated from leaves of *Pisum sativum* cv. Ctirad (internal reference standard) and leaves of the following mother plants: **a)** *Olea maderensis*; **b)** *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*.

Table II.4.3 – Genetic variability assessment of the micropropagation process in *Olea maderensis* and *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* using flow cytometry.

		DNA index		Mean DNA content	<i>n</i>
		Mean	SD	(pg/2C) ¹	
<i>O. maderensis</i>	Mother plants	0.672	0.007	6.11 <i>a</i>	9
	In vitro plants	0.664	0.010	6.03 <i>a</i>	6
	Acclimatized plants	0.611	0.003	5.55 <i>b</i>	5
<i>O. var. sylvestris</i>	Mother plants	0.355	0.003	3.23 <i>b</i>	10
	In vitro plants	0.347	0.002	3.15 <i>a</i>	15
	Acclimatized plants	0.349	0.002	3.17 <i>a</i>	5

Note: Values are given as the mean and standard deviation of the mean of the DNA index (ratio between the mean fluorescence of nuclei at the G₁ phase of the cell cycle of sample and internal reference standard), as well as the mean nuclear DNA content (pg/2C). The number of replicates analysed in each case is also given. Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

SSR analyses

The genetic variability of micropropagated plants of both species was further evaluated by using ten nuclear microsatellite markers. Amplification of the SSR loci involved the use of ten primer pairs that produced 47 reproducible alleles that ranged from 120 bp to 256 bp in size (Table II.4.4). Two loci, AJ279858 and AJ279865, resulted in a profile with only one band (allele) for *O. var. sylvestris*, representing homozygous individuals, whilst the other eight loci resulted in banding patterns with two bands (alleles) corresponding to heterozygous individuals of a diploid species. However, for *O. maderensis* microsatellite profiles presented from 2 to a maximum of 4 bands (alleles) which, as already shown above, concur with the fact that this is a tetraploid species. All the primer pairs produced monomorphic amplification products either across all the in vitro and acclimatized plants derived from the two species or between them and their respective mother plants, revealing the absence of genetic changes at this level (see illustrative electropherograms in Figure II.4.4).

Table II.3.4 – Allele size of the 10 microsatellite loci amplified in *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* and *Olea maderensis* from Madeira Archipelago and their derived micropropagated plants.

Locus	Allele size (bp)					
	Mother plants		In vitro plants		Acclimatized plants	
	<i>O. var. sylvestris</i>	<i>O. maderensis</i>	<i>O. var. sylvestris</i>	<i>O. maderensis</i>	<i>O. var. sylvestris</i>	<i>O. maderensis</i>
AJ279854	236/250	205/236/256	236/250	205/236/256	236/250	205/236/256
AJ279856	197/203	192/195/199	197/203	192/195/199	197/203	192/195/199
AJ279858	139	121/136/142//152	139	121/136/142//152	139	121/136/142//152
AJ279859	165/190	170/176/186	165/190	170/176/186	165/190	170/176/186
AJ279865	144	121/133/163/168	144	121/133/163/168	144	121/133/163/168
AJ279867	177/183	160/168/185/193	177/183	160/168/185/193	177/183	160/168/185/193
AJ416320	210/212	191/209	210/212	191/209	210/212	191/209
AJ416321	211/215	195/198/207	211/215	195/198/207	211/215	195/198/207
AJ416322	120/138	135/138/140	120/138	135/138/140	120/138	135/138/140
AJ416323	184/191	183/187/191/193	184/191	183/187/191/193	184/191	183/187/191/193

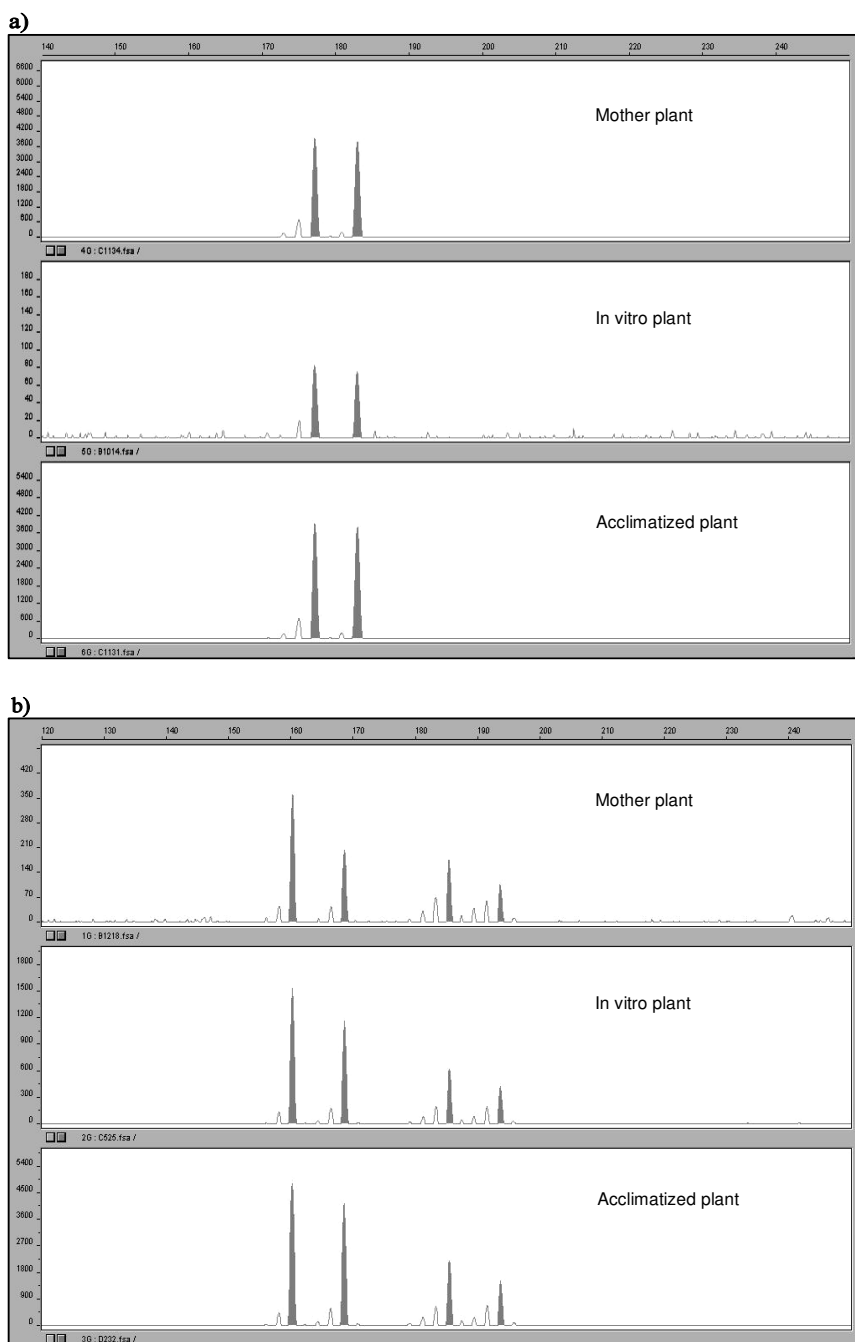


Figure II.3.4 – a) Amplification of *ssrAJ279867* (HEX) locus in *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* (from top to bottom): mother plant, in vitro plant and an acclimatized plant. Electropherograms corresponding to the mother plant and micropropagation-derived plants are similar and show heterozygous individuals with two alleles of ca. 177 bp and 183 bp, respectively. **b)** Amplification of *ssrAJ279867* (HEX) locus in *O. maderensis* (from top to bottom): mother plant, in vitro plant and an acclimatized plant. All electropherograms are similar and show heterozygous individuals with four alleles of ca. 160 bp, 168 bp, 185 bp and 193 bp, respectively. Top scale indicates fragment size in nucleotides. Left scale indicates fluorescence intensity measured in relative fluorescence units.

II.4.4 Discussion

Micropropagation protocols

In the present work, two simple, efficient and long-term in vitro protocols for regenerating two wild olive species, *Olea maderensis* and *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* are described. Olive medium (OM), the most commonly used medium to micropropagate olive species (e.g. Rugini 1984, Cozza et al. 1997, Brhadda et al. 2003, Zacchini and De Agazio 2004), was also the most adequate medium to induce explant sprouting in *O. var. sylvestris*, suggesting that the macro and micronutrients combination developed by Rugini (1984) is well balanced for this species. Nevertheless, due to the deficient responses of *O. maderensis* explants to OM, we enriched this medium with Fe, Mg, Mn (OMG) (Brito et al. 2009) allowing the successful micropropagation of *O. maderensis*. Due to these different behaviours, results described herein are based on two different micropropagation protocols, where the basal medium OM was adopted for *O. var. sylvestris* and OMG was used for *O. maderensis*. To assess micropropagation efficiency of these two species, several growth parameters were measured.

Growth parameters data revealed that *O. maderensis* presented, on average, better performance in elongation and proliferation rates, but comparisons between these two species must be regarded carefully as two different media were used. Apical dominance is recurrently reported for commercial cultivars of *O. europaea* (e.g. cultivar Nebbiara, Zacchini and De Agazio 2004), and it is mostly associated with apical explants. The use of basal segments may overcome apical dominance, suggesting that explants deprived of the apical bud force the sprouting of axillary buds (Rugini et al. 2000; Zacchini and De Agazio 2004).

Rooting is another crucial step in any micropropagation protocol. Based on the previous information on the literature (Cozza et al. 1997, Grigoriadou et al. 2000, Mencuccini 2003, Zacchini and De Agazio 2004, OEPP/EPPO 2006, Brito et al. 2007), we are able to attain a rooting strategy that was suitable for each of the two species. Once again, it is interesting to notice that each species responded differently to the rooting media. In *O. maderensis*, rooting induction in the dark in the presence of NAA proved to be a very efficient strategy, with 84% of the plants developing roots after 1 month. This strategy revealed to be inefficient for *O. var. sylvestris*. Beneficial effects of rooting in the dark have already been reported in other olive species/cultivars (e.g. Roussos and Pontikis 2002, Mencuccini 2003, Zacchini and De Agazio 2004). This stimulatory effect of the dark may be due to a higher/faster metabolism of endogenous or exogenous auxins when compared to the light. Also, high light intensity may stimulate ABA production and

other phenolic compounds that compromise rooting ability (Anderson 1984). An auxin shock for 2 min. induced positive, but at low extent, rooting responses in both wild olive species. IBA has been widely used as a root inducing hormone in olive (e.g. Cozza et al. 1997; Grigoriadou et al. 2002), but to our knowledge, the auxin shock strategy has been rarely reported in olive micropropagation protocols (but see Brito et al. 2007).

The acclimatization procedure was similar for both species and revealed to be very successful, with 33% and 97% of surviving rates being achieved in *O. var. sylvestris* and *O. maderensis*, respectively. The fact that the acclimatization was started under in vitro conditions revealed to be crucial for plant survival in both species, as it facilitated plant adaptability to the ex vitro environment (for review see Pospíšilová et al. 1999). Acclimatized plants from both species look healthy and morphologically normal, having well hardened and developed stems and dark green leaves.

Finally, the different performance of these two species, may be due not only to external factors (medium composition) but, mostly to endogenous factors, in particular genetic characteristics, such as the ploidy level (*O. maderensis* is a tetraploid species while *O. var. sylvestris* is a diploid species) (Brito et al. 2008). Positive effects of polyploidy on plant traits such as vegetative vigor, drought tolerance and pest resistance are well known in flowering plants (Osborn et al. 2003), and may also have played a significant role in this case. Also, it is generally assumed that polyploid species may be more susceptible to somaclonal variation than diploid ones (e.g. Karp 1995). These variations are prone to occur in any micropropagation protocol and depend on the type of explant and environmental stressing conditions. However, the method of plant propagation by stem cuttings adopted here is largely considered of low-risk for genetic instability (e.g. Goto et al. 1998), once organized meristems are more resistant to genetic changes than unorganized meristems/callus. Therefore, and to ensure a true-to-type propagation protocol, these micropropagated plants were evaluated for genetic stability.

Assessment of genetic variability

Changes in DNA ploidy level (either polyploidization or aneuploidy) and/or in DNA sequence are among the most frequent genetic variations found in in vitro cultures. Propidium iodide (PI) is currently considered the most suitable fluorochrome to quantify DNA, due to its sensitivity and stoichiometric intercalation into the DNA helix. Using this fluorochrome, our DNA histograms presented a good quality. Our results confirmed previous data reporting that *O. maderensis* is tetraploid (Brito et al. 2008), while *O. var. sylvestris* is diploid, similarly to other commercial olive cultivars (Brito et al. 2008, Loureiro et al. 2007b).

The analysis of ploidy level in two stages of the micropropagation protocol, showed for each species, high homogeneity pattern among individuals of the same stage/population (field, micropropagated and acclimatized plants), supporting the robusticity of the technique.

These flow cytometric analyses clearly revealed that polyploidization was absent. Moreover, the small difference in nuclear DNA amount (app. 9 %) found between acclimatized plants and both in vitro material and mother plants in *O. maderensis* suggests the possibility of aneuploidy occurrence. Nonetheless, previous works show that this type of small variation may be due to the interference of cytosolic compounds with DNA-PI staining (Loureiro et al. 2006). DNA-PI intercalation, despite specific and highly DNA-sensitive, may be affected by cytosolic compounds, and the occurrence of minor fluctuations of these compounds among biological samples may lead to small deviations of final fluorescence (for details see Loureiro et al. 2006). The addition of β -mercaptoethanol, an antioxidant known to suppress the interference of secondary compounds (Loureiro et al. 2007b), may minimize small fluorescence deviations, though not necessarily suppress them. This interference was also reported in similar true-to-typeness studies for other woody plant species (Pinto et al. 2004, Loureiro et al. 2005), and even in DNA studies of some olive cultivars (Loureiro et al. 2007b). Also, in *O. var. sylvestris*, despite the detected differences were statistically significant, they were rather small (2.5 %) and well justified by technical related issues, such as instrument drift.

Further proofs for a genetic stability at the ploidy level come from the assessment of nuclear microsatellite markers. Contrarily to *O. var. sylvestris* (with one to two bands), *O. maderensis* microsatellite profiles presented from two to a maximum of four bands (alleles), which confirms that this species is a tetraploid, supporting FCM data and previous reports (Brito et al. 2008, Lopes et al. 2009). Moreover, in this study no genetic changes among different stages of micropropagation were found. The feasibility of these molecular markers, as well as RAPDs, RFLPs and AFLPs, to assess true-to-type micropropagation has long been certified, as endorsed by the increasing number of papers that have been published in recent years in several species. For instance, the absence of somaclonal variation in plant material micropropagated by stem cuttings was reported for the woody species *Cedrus libani* (Renau-Morata et al. 2005), *Robinia pseudocacia* (Bindyia and Kanwar 2003), *Pinus thunbergii* (Goto et al. 1998) and chestnut hybrids (Carvalho et al. 2004) using RAPDs. Also Fernandes et al. (2008), using AFLP and SSRs, described the absence of molecular changes in *Quercus suber* embryogenic cultures. In contrast, the occurrence of somaclonal variation in micropropagation by stem cuttings, detected by SSRs and other molecular markers, has been reported for other

woody species by several authors. For example, variation was found in *Eucalyptus tereticornis* using RAPDs and AFLPs (Tripathi et al. 2006), in *Malus pumila* using RAPDs (Modgil et al. 2005), in *Populus tremuloides* using SSRs (Rahman and Rajora 2001) and in *Robinia ambigua* using ISSRs (Guo et al. 2006). In the genus *Olea*, to our knowledge only three studies have followed this strategy to ensure true-to-typeness: for commercial cultivars of *O. europaea* var. *europaea*, both García-Férriz et al. (2002) and Leva et al. (2002) used RAPDs and reported no somaclonal variation of the plants regenerated by stem cuttings. Also, for these olive species, Lopes et al. (2009) using SSRs reported no changes between the mother plant and somatic embryos.

In general, SSRs are more reliable than RAPDs and less laborious than AFLPs, being excellent markers for detecting polymorphisms. In the particular case of the SSRs used in this study their usefulness in the detection of polymorphisms due to their hypervariability, has already been confirmed by previous works on *Olea* species (e.g. Sefc et al. 2000, De la Rosa et al. 2002). Considering that microsatellite loci consist of sites of preferential mutation of the genome, for these ten microsatellites we may assure a true-to-type propagation of the two studied *Olea* species. Nevertheless, the putative occurrence of changes in other sites of the genome cannot be totally excluded (Lopes et al. 2009).

In conclusion, we confirm the true-to-typeness (by assessing both morphological and genetic parameters) of two micropropagation protocols for two wild olive species. As far as we know, this is the first true-to-typeness screening using FCM and SSRs of micropropagated wild olives, and also the first report with respect to a complete micropropagation protocol (up to open greenhouse) of *O. var. sylvestris*. At present, these micropropagated plants are being integrated in a reforestation programme of Porto Santo Island as well as used on conservation programmes, mostly involving the endemic and endangered *O. maderensis*, a strong candidate for the priority sites of the Natura 2000 networking programme.

Acknowledgments

Authors thank Direcção Regional de Florestas and Secretaria Regional da Educação from Madeira Autonomous Region and Porto Santo Town Hall. Thanks are also due to Armando Costa for laboratory assistance. This work was supported by the project FCT-POCTI/AGR/60672/2004. FCT is also thanked for the fellowships to Tina Lopes (FCT/SFRH/BPD/6012/2001), João Loureiro (FCT/SFRH/BPD/36601/2007) and Eleazar Rodriguez (FCT/SFRH/BD/27467/2006).

References

- Anderson W.C. (1984). Revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 343-347.
- Bindya K., Kanwar K. (2003). Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L. *Euphytica* 132: 41-47.
- Brhadda N., Abousalim A., Loudiyi D.W., Benali D. (2003). Effects of culture medium on the micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Moroccan Picholine. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 7 (3-4): 177-182.
- Brito G., Costa A., Fonseca H., Santos C. (2003). Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* in vitro shoots to osmotic stress. *Scientia Horticulturae* 97: 411-417.
- Brito G., Jardim R., Coelho C., Santos C. (2007). Micropropagação de uma espécie autóctone de Porto Santo como estratégia de combate à desertificação: exemplo da oliveira brava. *Silva Lusitana* 15(2): 229-247.
- Brito G., Loureiro J., Lopes T., Rodriguez E., Santos C. (2008). Genetic characterization of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:657-664.
- Brito G., Santos C. (2009). Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. *Canadian Journal of Forest Research* 39(4): 814-822.
- Burg K., Helmersson A., Bozhko P., Von Arnold S. (2007). Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine. *Journal of Experimental Botany* 58: 687-698.
- Canas L.A., Benbadis A. (1988). In vitro plant-regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Science* 54: 65-74.
- Canas L.A., Carramolino L., Vicente M. (1987). Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos. *Plant Science* 50: 85-90.
- Carvalho L., Goulão L., Oliveira C., Gonçalves J.C., Amâncio S. (2004). RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of in vitro propagated chestnut hybrids. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77: 23-27.
- Conde P., Loureiro J., Santos C. (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Reports* 22: 632-639.

- Cozza R., Turco D., Bati C., Bitonti M.B. (1997). Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 51: 215–223.
- De la Rosa R., James C.M., Tobutt K.R. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes* 2: 265–267.
- Doležal J., Sgorbati S., Lucretti S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. - *Physiologia Plantarum* 85: 625–631.
- Fernandes P., Rodriguez E., Pinto G., Roldán-Ruiz I., De Loose M., Santos C. (2008). Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiology* 28: 1841–1850.
- García J.L., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso A. (2002). Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69:95–100.
- García-Férriz L., Ghorbel R., Ybarra M., Mari A., Belaj A., Trujillo I. (2002). Micropropagation from adult olive trees. IV International Symposium on Olive Growing. *Acta Horticulturae* 586: 879–882.
- Goto S., Thakur R.C., Ishii K. (1998). Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. *Plant Cell Reports* 18: 193–197.
- Grigoriadou K., Vasilakakis M., Eleftheriou E.P. (2002). In vitro propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71: 47–54.
- Guo W., Li Y., Gong L., Li F., Dong Y., Liu B. (2006). Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 343–351.
- Karp A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295–302.
- Leva A.R., Petruccelli R., Montagni G., Muleo R. (2002). Field performance of micropropagated olive plants (cv. Maurino): Morphological and molecular features. IV International Symposium on Olive Growing. - *Acta Horticulturae* 586: 891–894.
- Lopes T., Capelo A., Brito G., Loureiro J., Santos C. (2009). Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites. *Trees* 23: 29–36.

- Lopes T., Pinto G., Loureiro J., Costa A., Santos C. (2006). Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. *Tree Physiology* 26: 1145-1152.
- Loureiro J., Capelo A., Brito G., Rodriguez E., Silva S., Pinto G., Santos C. (2007a). Micropropagation of *Juniperus phoenicea* L. adult plants and ploidy stability analyses in micropropagated plants using flow cytometry. *Biologia Plantarum* 51 (1): 7-14.
- Loureiro J., Pinto G., Lopes T., Doležal J., Santos C. (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* 221: 815-822.
- Loureiro J., Rodriguez E., Costa A., Santos C. (2007b). Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris*) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54: 21-25.
- Loureiro J., Rodriguez E., Doležal J., Santos C. (2006). Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany* 98: 515-527.
- Malá J., Bylinský V. (2004). Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. - *Biol. Plant.* 48: 633-636.
- McCown, B.H., Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. *Hortscience* 16: 453-453.
- Mencuccini M. (2003). Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 97: 129-139.
- Modgil M., Mahajan K., Chakrabarti S.K., Sharma D.R., Sobti R.C. (2005). Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Scientia Horticulturae*. 104:151-160.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- OEPP/EPPO. (2006). Pathogen-tested olive trees and rootstocks. *Bulletin OEPP/EPPO* Bulletin 36: 77-83. Accessed 16 June 2008 in: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118562423/PDFSTART>.
- Osborn T.C., Pires J.C., Birchler J.A., Auger D.L., Chen Z.J., Lee H.S., Comai L., Madlung A., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R.A. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*. 19:141-147.

- Pinto G., Loureiro J., Lopes T., Santos C. (2004). Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. Theoretical and Applied Genetics 109: 580–587.
- Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., Plzáková Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. Biologia Plantarum 42: 481-497.
- Rahman M.H., Rajora O.P. (2001). Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). Plant Cell Reports 20:531-536.
- Rallo P., Dorado G., Martín A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). Theoretical and Applied Genetics. 101: 984-989.
- Rallo P., Tenzer I., Gessler C., Baldoni L., Dorado G., Martín A. (2003). Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. Theoretical and Applied Genetics 107: 940–946.
- Renau-Morata B., Nebauer S.G., Arrillaga I., Segura J. (2005). Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of *Cedrus*: consequences of axillary bud breaking. Tree Genetics & Genomes 1: 3-10.
- Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R. (1996). In vitro reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. - In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 32: 257-261.
- Roussos P.A., Pontikis C.A. (2002). In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. Plant Growth Regulation 37: 295–304.
- Rugini E. (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. Scientia Horticulturae 24:123-134.
- Rugini E., Biasi R., Muleo R. (2000). Olive (*Olea europea* var. *sativa*) transformation. In: Molecular Biology of Woody Plants. Jain S.M., Minocha S.C. (eds.). Vol. 2, pp. 245-279. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London.
- Santos C., Brito G., Pinto G., Fonseca H. (2003). In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *madeirensis*. Scientia Horticulturae 97: 83-87.
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonça D., Rodrigues dos Santos M., Laimer Da Câmara Machado M., Da Câmara Machado A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Molecular Ecology 9:1171-1173.
- Tripathi S.B., Mathish N.V., Gurumurthi K. (2006). Use of genetic markers in the management of micropropagated *Eucalyptus* germplasm. New Forests 31: 361-372.

Wilhelm E., Hristoforoglu K., Fluch S., Burg K. (2005). Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.). Plant Cell Reports 23: 790-795.

Zacchini M., De Agazio M. (2004). Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. Biologia Plantarum 48(4): 589-592.

Capítulo II.5

Large scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey

Aclimatização a campo de plantas micropropagadas de *Olea maderensis* em larga escala: estudos morfológicos e fisiológicos

Chapter published as an original paper in a SCI journal:

Brito G., Costa A., Coelho C., Santos C. (2009). Large scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey. *Trees* DOI: 10.1007/s00468-009-0344-x (*online first*).

Abstract

Micropropagation allows large-scale plant multiplication and germplasm preservation, representing an added value in forest breeding strategies to combat desertification and (or) protect endangered species. We developed a large-scale micropropagation protocol of *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco (a native endangered wild olive of Madeira Archipelago) using OMG medium (rich in Fe, Mg and Mn) supplemented with zeatin for elongation and with NAA for rooting. We now describe the performance of micropropagated plants during five-period field acclimatization: a) in vitro, b) growth-cabinet, c) greenhouse; d) open-greenhouse and e) field mountain in Porto Santo Island. One hundred OG4 plants were acclimatized, showing >95% surviving rates. During acclimatization, several physiological parameters were evaluated: water content remained higher in in vitro/greenhouse conditions, decreased in field leaves. Soluble protein contents decreased during the first acclimatization periods increasing thereafter. Membrane permeability slightly increased during the field acclimatization. Chlorophylls content increased in in vitro leaves, while during acclimatization, mostly chl *b* decreased, increasing chl *a*/chl *b* ratio. F_0 decreased in first acclimatization periods, increasing thereafter, while the other parameters (F_v ; F_m ; F_v/F_m) decreased. Nutrient contents decreased in plants transferred to poor field soil conditions, reaching values similar to mother plant leaves. Overall, with the exception of PSII fluorescence, field acclimatized plants had similar values to mother plants, showing a good adjustment to stressful field conditions. This protocol is being used in large scale micropropagation within a reforestation programme and is an example of R&D technologies with immediate application on protection of endangered ecosystems.

Keywords: forestation; nutrients; olive micropropagation; OMG medium; osmolality; photosynthesis.

II.5.1 Introduction

Olive is one of the most important fruit trees cultivated in the Mediterranean basin with a wide range of adaptability and comprises several economically important cultivars and wild olive genotypes. *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. & Del Arco (wild olive) (Brito et al. 2008) is an endemic and endangered tree native to the Madeira Archipelago and is a particularly important component of the arboreal climatic community (micro-forest) named Zambujal that occurs in dry infra-Mediterranean climate (Sequeira et al. 2007)

In Porto Santo Island, a serious process of desertification and land degradation is occurring, with only a few isolated individuals of *O. maderensis* being found, and generally in inaccessible rifts, where they survive under adverse environmental conditions (Sequeira et al. 2007). Propagation and preservation of this species is very important owing to its endangered status in the Archipelago. However, conventional propagation of this species is hampered by the poor germination rates and low seed production and by the poor ability of plant production by macrocuttings. Therefore, the optimization of micropropagation strategies (providing production of genetically identical plants of conventional propagation recalcitrant species) will allow using this endangered species on reforestation programs in Porto Santo Island (Brito et al. 2009).

In the last decades, the intense research activity developed in micropropagation of *Olea* genus was almost restricted to commercial cultivars (e.g. Briccoli Bati et al. 2006; Peixe et al. 2007; Rugini 1984, Zacchini and De Agazio 2004; Zuccherelli and Zuccherelli 2002). However there is not enough knowledge for its use in a mass scale nursery production (Peixe et al. 2007; Zuccherelli and Zuccherelli 2002). Furthermore, little is known about the micropropagation of other *Oleaceae* species and (or) genotypes with environmental relevance (Brito et al. 2003, 2007b; Lopes et al. 2009; Lucchesini and Mensuali-Sodi 2004; Santos et al. 2003). We recently developed an efficient protocol for routinely micropropagate *O. maderensis* plants (Brito et al. 2009).

The ultimate success of in vitro propagation in a reforestation program depends on a reliable acclimatization protocol, ensuring low cost and high survival rates (Hazarika 2006). In vitro protocols provide minimal stress and optimum conditions for shoot/plant multiplication (Hazarika 2006). As a consequence of these special conditions (e.g. high air humidity, low irradiance, low CO₂ during photoperiod, high levels of sugars as carbon source and growth regulators), in vitro grown plantlets usually exhibit abnormal morphology, anatomy and (or) physiology (Hazarika 2006; Pospíšilová et al. 1999; Premkumar et al. 2001). Under these conditions, in vitro plantlets can develop specific

features (e.g. non functional roots and/or stomata) that are inconsistent with the development under greenhouse or field conditions. Also the mixo-heterotrophic mode of nutrition and poor mechanism to control water loss render micropropagated plants vulnerable to the transplantation shocks when directly placed in a greenhouse or field.

Understanding the physiological characteristics of micropropagated plants and the changes they undergo during the hardening process should facilitate the development of efficient transplantation protocols and will help to make decisions on, if necessary, adjusting environmental conditions (e.g. irrigation, soil fertilization). (Hazarika 2006). For example, water/osmotic stress is often the cause of micropropagated plants mortality and its monitorization is particularly important when acclimatization occurs in a degraded land as is the case (Brito et al. 2003). Also as the Island is exposed to high insolation levels (app. 2242 hour/year), surveying photosynthesis related parameters will give information on photooxidation risk and will allow to prevent it. Finally, nutrient analysis is a crucial approach when dealing with plant acclimatization to poor soils as it is the case of Porto Santo. Moreover, the physiological behaviour of micropropagated olive plants in the field is still scarcely known compared to plants from grafted or own-rooted cuttings (Briccoli Bati et al. 2006).

In this work we present a successful field acclimatization protocol of *Olea maderensis*, based on the controlled exposure to low relative humidity and high light intensity. In order to evaluate field performance of the micropropagated plants, physiological parameters were assayed on shoots and plants during in vitro and after transfer to ex vitro conditions. Therefore, we followed surviving and elongation rates and other physiological features (chlorophyll fluorescence, chlorophyll content, membrane integrity, water content, osmolality, soluble protein and mineral composition) in *O. maderensis* micropropagated plants from in vitro to field conditions.

II.5.2 Materials and methods

Micropropagation studies

Plant material, in vitro establishment and rooting

Cuttings from five field-grown adult *Olea maderensis* trees from Madeira and Porto Islands [> 30 years, genotype OG4 was collected in 2004, Figure II.5.1-A, and the others (OG9-OG12) were collected in 2007, see Table II.2.1, pg. 123] were collected and

disinfected according to Brito and Santos (2009)⁷. Disinfected cuttings, 3 cm-long, comprising one or two axillary bud(s) were placed on solid (0.7% agar) induction media OMG that is a modified OM medium (Rugini 1984), enriched with the double concentration of FeNaEDTA, MgSO₄ and MnSO₄ as described by Brito and Santos (2009). The sprouted shoots were then transferred to elongation-proliferation medium, consisting on the same basal medium (OMG) but supplemented with 9.12 µM zeatin (Brito et al. 2009). For shoot proliferation and germplasm long term maintenance, subcultures were performed monthly. Cultures took place at 22 ± 1 °C, with a photoperiod of 16 h and an average light intensity of 45 µmol m⁻² s⁻¹.

For shoot rooting, the methodology described by Brito and Santos (2009) was followed. Briefly, apical segments with 2-3 cm-long and with 2 or 3 nodes were incubated, for five days in dark, on half-strength OMG medium (½ OMG) with 3.22 µM NAA, and then transferred to ½ OMG medium without growth regulators (½ OMG_{WH}) where they remained for at least 1 month. This procedure was carried out in three independent experiments with 20 apical segments in each experiment. After one month and a half, several parameters were measured in shoots (*n*=20): shoot growth, number of leaves, number of nodes, number of newly formed roots, length of roots and percentage of rooting shoots. Data concerning rooting only report to OG4 shoots (Table II.5.1). Then, a total of 100 plants were used for acclimatization procedures.

This micropropagation protocol was established first for OG4, and presently it is being used in micropropagation of all five genotypes (OG4 and OG9-OG12). However, as plants in the field are screened from 2006, data presented here concern only to the clone population of OG4 tree. Therefore, data concerning acclimatization procedures only report to OG4 plantlets.

Plant acclimatization

Acclimatization (one hundred OG4 plantlets) started when, at least, 2-4 roots with 5-10 cm length were developed, and a five-period acclimatization strategy was followed:

(i) *In vitro Acclimatization*: in vitro plantlets were transferred to sterile plastic vessels (120 ml volume) with a sterilised mixture of peat:vermiculite (1:3, w/w) wet with ½ OMG liquid medium (with no sucrose or growth regulators). These vessels were introduced inside glass vessels (650 ml volume), and maintained for one month in growth chamber conditions (see above) (Figure II.5.1-F).

⁷ As all explants from Porto Santo Island developed fungus infection after 1-2 months in vitro, all experiments/measurements were performed with the genotypes from Madeira Island.

(ii) *Growth-cabinet Acclimatization*: plastic vessels with plantlets were removed outside the glass vessels and transferred to a growth-cabinet with the same temperature and photoperiod as before, but with progressive decreasing of relative humidity (%RH) from 100 to 90% (longer spacing between fogging day after day, steadily decreasing %RH) and with an average of light intensity of $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Occasional treatments with 1 g.L^{-1} of fungicide solution Benlate® were made. Plants were maintained on this growth-cabinet for two months (Figure II.5.1-G).

(iii) *Greenhouse Acclimatization*: plants were placed in a greenhouse, and subjected to low RH from 90 to 70% and to an average of light intensity of $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for 2-3 months.

(iv) *Open greenhouse Acclimatization*: greenhouse acclimatized plants were transferred to an open greenhouse in Porto Santo Island, and placed on pots with peat:natural soil with vegetal organic matter (1:3, w/w), subjected to low RH from 70 to 50% and higher light intensity ($200\text{-}400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at noon) (Figure II.5.1-H). Plants remained in the open greenhouse for 10 months.

(v) *Field Acclimatization*: plants were transferred in December 2006 to the field (open spaces of Island mountains mostly reforested with *Pinus* species) (Figure II.5.1-I,J,L,M), with averages of RH from 60-40% and light intensity from $900\text{-}1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (at noon). Plants were surveyed regularly for survival and morphological aspects.

In the two final acclimatization periods (iv and v) plants were exposed to the uncontrolled climatic conditions of Porto Santo Island for an adjustment to the climatic/edaphic conditions. The soil of the selected site was characterized by Brito et al (2007a), and it is an alkaline soil poor in water content, with low organic matter (0.6%), and rich in Fe, Mg, and Mn and Na, while other nutrients are in deficit.

To evaluate plant growth and performance during acclimatization, several parameters were measured in plants ($n = 20$) on the different acclimatization periods: plant length, number of leaves, number of nodes, and number of new axillary shoots. Average plant elongation rates were calculated for two stages (Table II.5.2):

- a) Elongation rates between in vitro and greenhouse acclimatization periods (controlled light intensity, RH and temperature):

$$\text{Elongation} = \frac{(T_f(\text{plant length greenhouse}) - T_i(\text{plant length in vitro ac.}))}{n^\circ \text{ months}}$$

- b) Elongation rates between open greenhouse and field acclimatization periods (uncontrolled light intensity, RH and temperature):

$$\text{Elongation} = \frac{(T_f(\text{plant length field}) - T_i(\text{plant length open greenhouse}))}{n^\circ \text{ months}}$$

Physiological studies

Plant material

Leaves were collected and treated separately, for determination of the physiological parameters described below, from: a) OG4 mother plant in winter; b) OG4 shoots on elongation stage (one-year-old subcultures) after 30 days on OMG medium supplemented with 9.12 μM of zeatin and 3% c) OG4 plantlets on in vitro acclimatization (one month-old plants); d) OG4 plants acclimatized to greenhouse (five months-old plants); e) OG4 plants acclimatized to open greenhouse in Porto Santo Island (nine months-old plants) and f) OG4 plants in field (seventeen months-old plants established in field – two months after transplantation to field).

For water content, mineral composition and soluble protein content, results were averaged for groups of three leaves of three independent individuals (shoot or plant) on each stage of the micropropagation and acclimatization process. For chlorophyll content, results were averaged for groups of three leaves of six independent individuals (shoot or plant) on each stage of the micropropagation and acclimatization process. For fluorescence analysis (photosynthetic efficiency), results were averaged for groups of three leaves of nine independent individuals (shoot or plant) on each stage of the micropropagation and acclimatization process. For osmolality and membrane permeability, results were averaged for one leaf of three independent individuals (shoot or plant) on each stage of the micropropagation/acclimatization process.

Water content and osmolality

Water content was determined by the difference between fresh weigh (FW) and dry weigh (DW), after drying samples at 60 $^\circ\text{C}$ until weight stabilisation (during 1 week). For osmolality analysis, samples were submitted to freeze/unfreeze cycles to assure membrane rupture (Brito et al. 2003). Osmolality was determined by analysing samples of leaves using an automatic osmometer (Knauer, Berlin, Germany).

Chlorophyll and anthocyanin content

Leaf contents of chlorophyll *a*, *b* and anthocyanins were determined following procedures described by Sims and Gamon (2002), by homogenising tissue in cold acetone – Tris (80:20 v/v; pH=7.8). The absorbance of the extract solutions was measured with the Beckman DV68 spectrometer at 537; 647 and 663 nm. Chlorophylls and anthocyanins contents were calculated according to Sims and Gamon (2002).

Photosynthetic efficiency

Chlorophyll fluorescence was monitored using a Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instruments Ltd, England-UK). For assessing fluorescence parameters, plants were dark-adapted for 30 min at 22 ± 2 °C. Then, Photosystem II (PSII) fluorescence was monitored by illuminating leaves with a peak wavelength 650 nm and a saturating light intensity of $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Santos and Caldeira 1999).

Chlorophyll basal fluorescence (F_0), variable fluorescence (F_v), maximum fluorescence (F_m) and the ratio (F_v/F_m) were analysed (Maxwell and Johnson 2000).

Soluble protein content

Tissue samples (0.5 g) were homogenized at 4°C in 1 mL of 0.05 mol.L^{-1} potassium phosphate buffer (pH=7.8) containing 0.1 mmol.L^{-1} ethylenediamine tetraacetic acid, 5 mmol.L^{-1} cysteine, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, and 0.2 % Triton X-100 (Olmos et al. 1994). Homogenates were filtered and centrifuged at $8000g$ for 15 min, at 4°C. The supernatant was used to determine soluble protein content, following procedures described by Bradford (1976) and using a Total Protein Kit, Micro (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

Membrane permeability determination by solute leakage method

The removed leaf was incubated in 5 ml of deionized water at 25 °C on a rotary shaker (85 rpm). Ultraviolet-absorbing substances of the bathing solution were determined, after 24 h incubation (A_{280}) and after autoclaving (A'_{280}), spectrophotometrically (Beckman DV68). The relative leakage ratio (RLR) was calculated as $\text{RLR}=(A_{280}/A'_{280})$ and expressed as percentage (Azevedo et al. 2005).

Mineral composition:

Mineral content was determined in leaves, dried at 60 °C until weight stabilisation. Dried tissues were mineralised following procedures described by Azevedo et al. (2005) to determine the content of K, P, Ca, Mg, Mn, Fe, B, Cu and Zn elements. Elemental

contents were determined by Induced Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS) using a Jobin Ivon JY70 Plus.

Statistical analyses

Variations among the measured growth parameters and among determined values in each physiological parameter of the plants on the different micropropagation stages were analysed. One-way ANOVA was executed and a multiple comparison procedure (Tukey test) was used for a pairwise comparison. (SigmaStat for Windows Version 3.1, SPSS Inc., Richmond, CA, USA).

II.5.3 Results

Micropropagation and acclimatization

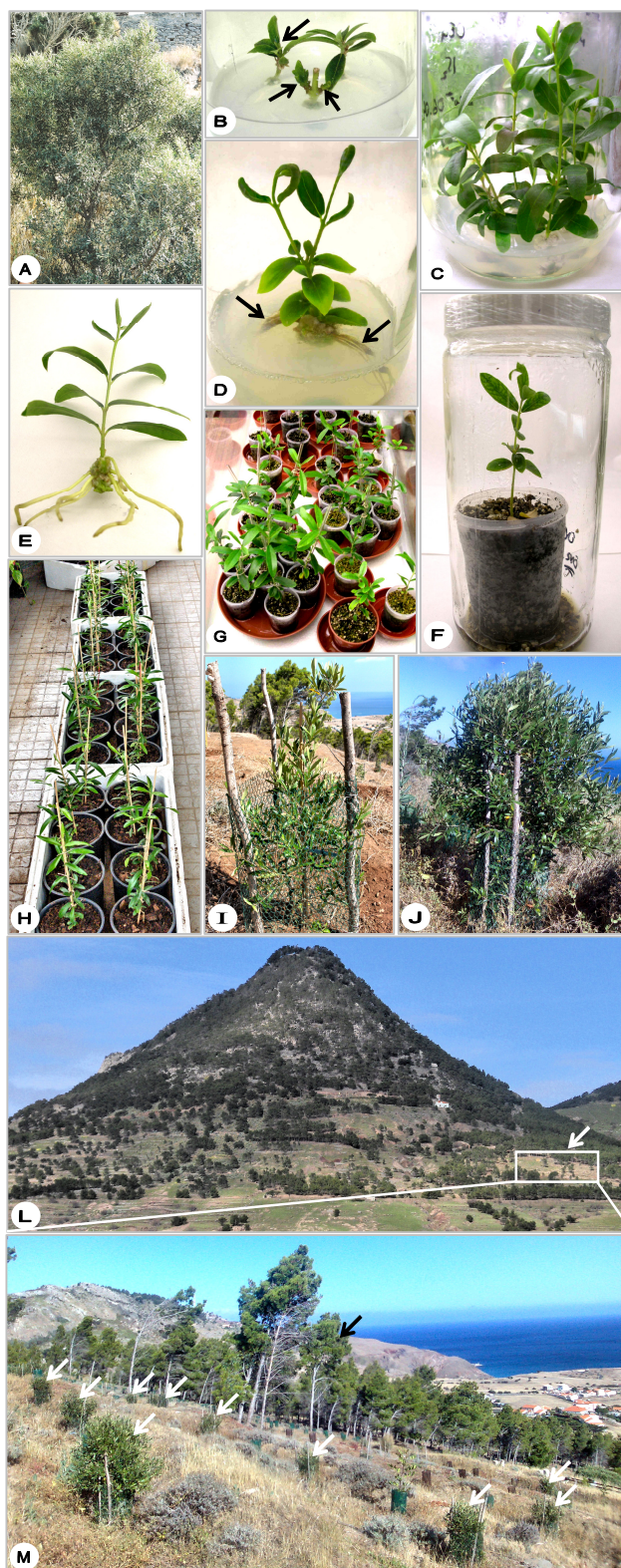
OMG medium successfully induced sprouting (>80%) in *O. maderensis*, which was obtained in 1 month (Figure II.5.1-B). After this period, the newly formed shoots were collected and transferred to elongation medium, and a stock material was obtained by subculturing shoots monthly. During elongation-proliferation stage shoots looked healthy, presented dark green leaves and good quality (Figure II.5.1-C). Rooting was successfully achieved (>84%) (Table II.5.1), and first roots appeared approximately after 4 weeks (Figure II.5.1-D, E). During rooting stage, it was observed shoot growth, the appearance of new leaves and nodes (Table II.5.1) and good quality of the newly formed roots (Fig. 1-D, E). Plantlets had hard stems, dark green leaves, looked healthy and morphologically identical. Also it was observed a good quality of the newly formed roots (Figure II.5.1-D, E). This strategy allowed large scale shoot multiplication and plant regeneration and simultaneous in vitro germplasm maintenance of this species for the last five years.

Table II.5.1 – Growth parameters during rooting stage (shoot growth, number of new leaves and nodes) and rooting characteristics of *O. maderensis* OG4 shoots.

Genotype	Shoot growth (cm)	No. of new leaves	No. of new nodes	Rooting shoot (%)	Number of roots (shoot ⁻¹)	Mean length of roots (cm)
OG4	0.98±0.09	1.81±0.43	0.87±0.16	84	5.94±0.75	6.73±0.36

Note: Values are means ± SE ($n = 20$) obtained over 6 weeks of growth in OMG_{WH} (from three independent experiments).

Figure II.5.1 – Stages of efficient micropropagation of *Olea maderensis* (genotype OG4) (A) an example of one of the few *O. maderensis* trees existing in Madeira Archipelago, used as **Mother Plant**; (B) Cuttings with axillary buds sprouted, after 30 days on induction medium (OMG_{WH}) (arrows: axillary buds); (C) Shoots on **elongation** stage (one year-old subcultures) after 30 days on OMG medium supplemented with 9.12 µM of zeatin; (D) Rooted shoots after 30 days in rooting medium (½ OMG_{WH}) (arrows: roots); (E) Plants before acclimatization, showing a well developed rooting system; (F) One month-old regenerated plant in **in vitro** **acclimatization** on a pot with peat:vermiculite (1:3) (plant with app. 4.5 cm length); (G) Three months-old acclimatized plants in **greenhouse** on pots with peat:vermiculite (1:3) (plants with app. 10 cm length on average). (H) Nine months-old acclimatized plants in **open greenhouse** in Porto Santo Island (plants with app. 35 cm length on average). (I) Two years-old established plant in **field** (seven months after transfer to field, with app. 90 cm length); (J) Established plant, in **field** (one year after transfer to field, with app. 110 cm length); (L) Mountain on Porto Santo Island (named Pico do Castelo) to where micropropagated plants were transferred (white arrow – open space in forest where plants were cultivated). (M) **Field** on Pico do Castelo with micropropagated plants of *O. maderensis* (black arrow – forest zone with *Pinus*; white arrows – micropropagated plants of *O. maderensis*).



Plant acclimatization described here reports only to data of OG4 plants, which were transferred to field in 2006. Acclimatization was developed in five periods, being initiated in vitro (Figure II.5.1-F) and after one month transferred to a growth-cabinet. *O. maderensis* showed excellent plant acclimatization results, with an average of 97% of plant survival in the growth-cabinet and greenhouse (Figure II.5.1-G). Plants were transferred five months latter to an open greenhouse in Porto Santo Island, where they grew healthy for 10 months with survival rates of 100% (Figure II.5.1-H). After this period plants were transferred to field in Porto Santo Island where they were established at a survival rate of 100% (Figure II.5.1-I,J,L,M).

Some growth parameters were evaluated during the acclimatization stages (Table II.5.2). In general, all plants showed healthy performance, looked morphologically identical and had active growth. The elongation rate in the first stage of acclimatization (from in vitro till greenhouse condition) was on average 2.36 cm.month⁻¹, lower than the elongation rate (5.99 cm.month⁻¹) from the open greenhouse to field conditions on Porto Santo Island. Also the mean values of the number of leaves and nodes per plant increased significantly ($P<0.05$) during acclimatization. The number of new axillary shoots in each plant increased extraordinarily ($P<0.05$) in the last stages of acclimatization (Table II.5.2).

Table II.5.2 – Growth parameters measured during different periods of acclimatization of *O. maderensis* OG4 plants

Acclimatization periods	Age (months)	Plant length (cm)	No. of leaves	No. of nodes	No. of new axillary shoots	Elongation cm.month ⁻¹
In vitro	1	4.48±0.14 a	8.19±0.44 ad	5.24±0.18 a	0.00±0.00 a	2.36
Growth - cabinet	2	6.86±0.36 ad	11.24±0.81 af	6.67±0.30 ad	0.00±0.00 a	
Greenhouse	5	16.29±0.90 cd	23.35±1.06 ef	12.53±0.50 cd	2.06±0.42 ad	
Open greenhouse	9	35.47±1.32 bc	39.35±2.04 ce	21.71±1.32 bc	2.94±0.37 cd	5.99
Open greenhouse	15	79.59±2.82 b	184.53±5.71 bc	31.00±0.83 b	17.18±0.96 bc	
Field	17	83.41±2.91 b	210.94±6.78 b	34.82±0.99 b	23.00±1.32 b	

Note: Values are means ± SE ($n = 20$). Elongation is given as cm.month⁻¹. For each parameter (column), means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Physiological studies

Performance of plants during micropropagation stages was evaluated by analysing several physiological parameters.

Figures II.5.2 to II.5.8 present results of the physiological studies performed during micropropagation/acclimatization process, and the sequence described in Figures II.5.2 to II.5.7 refers to: M plant – mother plant; Elong - shoots on elongation stage (one-year-old

subcultures) after 30 days on OMG medium supplemented with 9.12 μM of zeatin; In vitro Ac – one month-old plants in in vitro acclimatization; Greenh – five months-old plants acclimatized to greenhouse; Op Greenh – nine months-old plants acclimatized to open greenhouse in Porto Santo Island; Field – seventeen months-old plants established in field (two months after transplantation to field). In Figure II.5.8 the sequence 1 to 6 refers to: M plant, Elong, In vitro Ac, Greenh, Op Greenh, Field, in same conditions above.

Water content and osmolality

Leaves from plants in field (mother plant and acclimatized plants in field) had on average significantly ($P < 0.05$) lower water content values than in vitro elongation shoots and the other acclimatized plants (first periods of acclimatization) (Figure II.5.2). On the other hand, leaf osmolality was not statistically different among the several micropropagation stages (Figure II.5.3), showing that growth conditions did not affect this parameter.

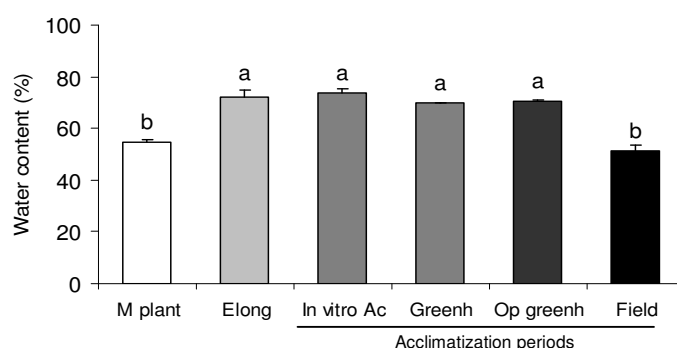


Figure II.5.2 – Water content of *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

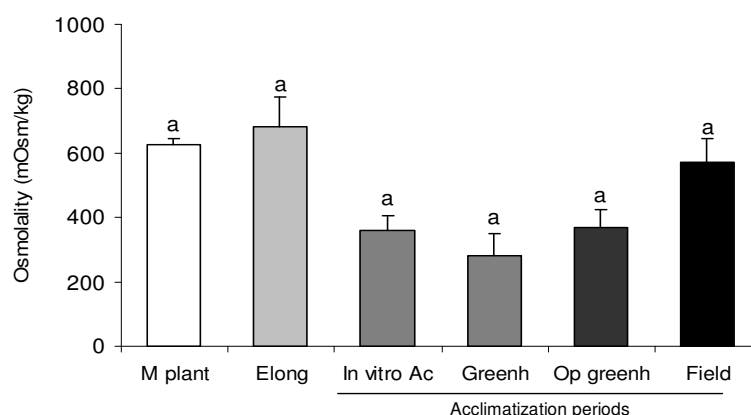


Figure II.5.3 – Osmolality in *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Chlorophyll and anthocyanin contents

Chlorophyll content data are reported in Figure II.5.4 (A-D). Chlorophyll *a* (chl *a*) content of in vitro leaves (elongation stage, 0.63 mg.g-1fw) did not differ ($P>0.05$) from those of the mother plant (0.57 mg/gfw). However, during the first periods of acclimatization chl *a* level increased ($P<0.05$; 0.68 mg.g-1fw) with respect to mother plant leaves. When plants were transferred to field, chl *a* level decreased ($P<0.05$; 0.59 mg/gfw) to mean values close to the mother plant.

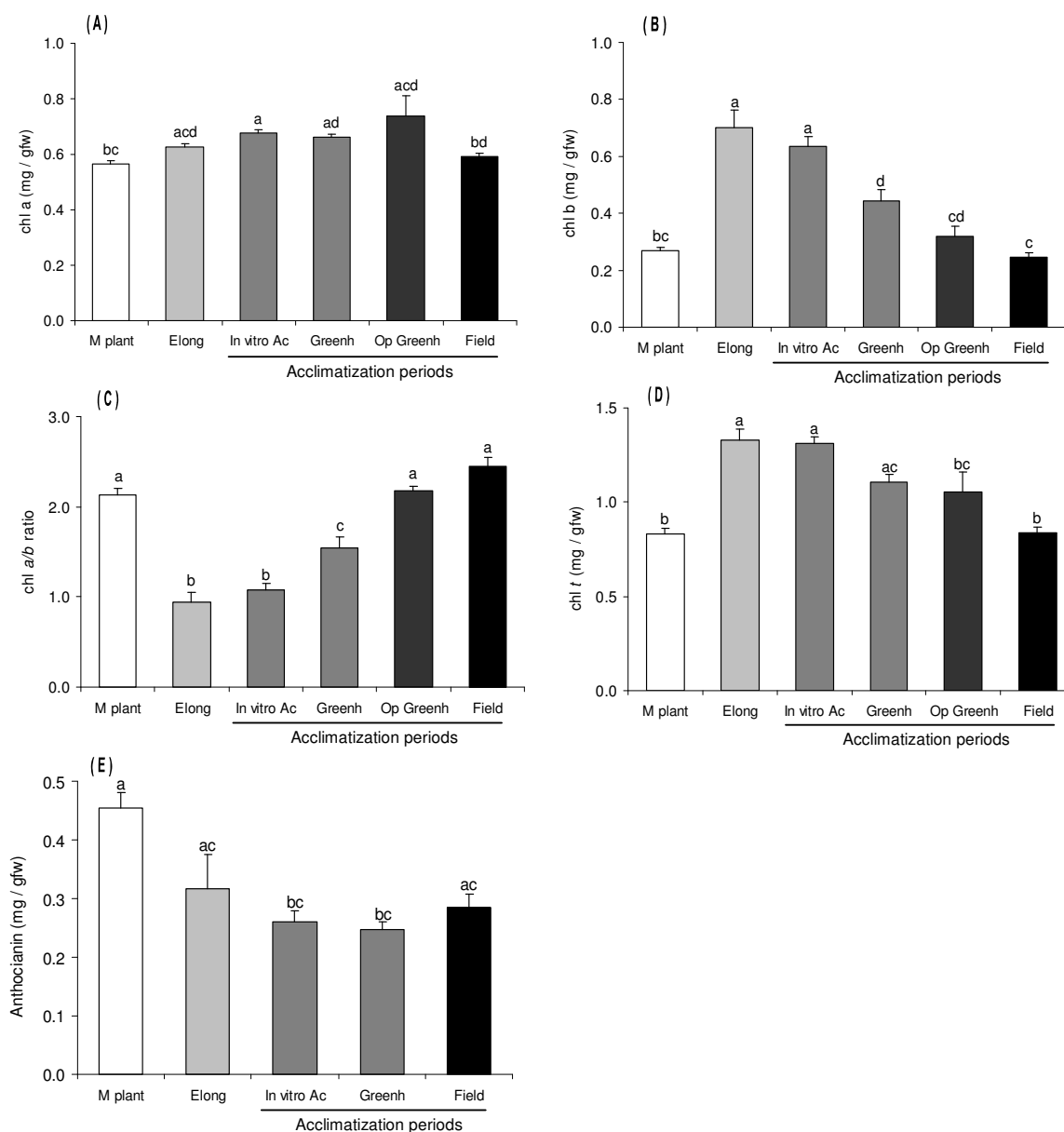


Figure II.5.4 (A-E) – Concentrations of: **(A)** chlorophyll *a* (chl *a*), **(B)** chlorophyll *b* (chl *b*), **(C)** chlorophyll *a/b* ratio (chl *a/b*), **(D)** total chlorophyll (chl *t*) and **(E)** anthocyanin in *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 6$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Chlorophyll *b* (chl *b*) content increased ($P<0.05$) in in vitro-grown leaves (elongation stage, 0.70 mg/gfw) and in first period of acclimatization (In vitro Ac, 0.64 mg/gfw) when compared to leaves of mother plant. Chl *b* level decreased ($P<0.05$) when plants were transferred to greenhouse (0.44 mg/gfw), and this level slightly decreased till field condition. However, in plants acclimatized to open greenhouse and to field, chl *b* level did not differ ($P>0.05$) from the one of the mother plant. In vitro-grown leaves had lower ($P<0.05$) chl *a/b* ratio than mother plant leaves. Afterwards it occurred an increase ($P<0.05$) during the acclimatization periods reaching values close to the mother plant. Chlorophyll *a/b* ratio from open greenhouse and field plants did not differ ($P<0.05$) from those of mother plant.

Total chlorophyll (chl *t*) increased ($P<0.05$) in leaves on elongation stage and this level was maintained in leaves on the two first periods of acclimatization (In vitro Ac and Greenh), and then decreased ($P<0.05$) when plants were transferred to open greenhouse and to field, compared to plants under in vitro acclimatization. Total chlorophyll content from open greenhouse and field plants did not differ ($P<0.05$) from those of mother plant.

Concerning anthocyanin content (Figure II.5.4-E) it significantly decreased ($P<0.05$) in leaves during in vitro and greenhouse acclimatization periods with respect to mother plant leaves. However, anthocyanin contents from leaves in the elongation stage to field acclimatization did not vary ($P>0.05$).

Photosynthetic efficiency

In the analysis of chlorophyll fluorescence parameters (Figure II.5.5-A-D), basal fluorescence (F_0) increased ($P<0.05$) in the elongation stage (Elong) compared to mother plant, while the other parameters (F_m , F_v , F_v/F_m) decreased ($P<0.05$). During acclimatization stage, F_0 decreased ($P<0.05$) on the first period (In vitro Ac), while in the subsequent periods until field condition it slightly increased although not significantly ($P>0.05$). The other parameters (F_m , F_v , F_v/F_m) showed an increase tendency (though not statistically significant, $P>0.05$) during the first periods of acclimatization remaining stable until open greenhouse condition. When plants were transferred to field, F_0 increased ($P<0.05$), while F_m , F_v , F_v/F_m decreased ($P<0.05$) compared with mother plant. However F_v/F_m ratio was on average close to 0.8 in all stages of micropropagation (mean values between 0.77-0.84).

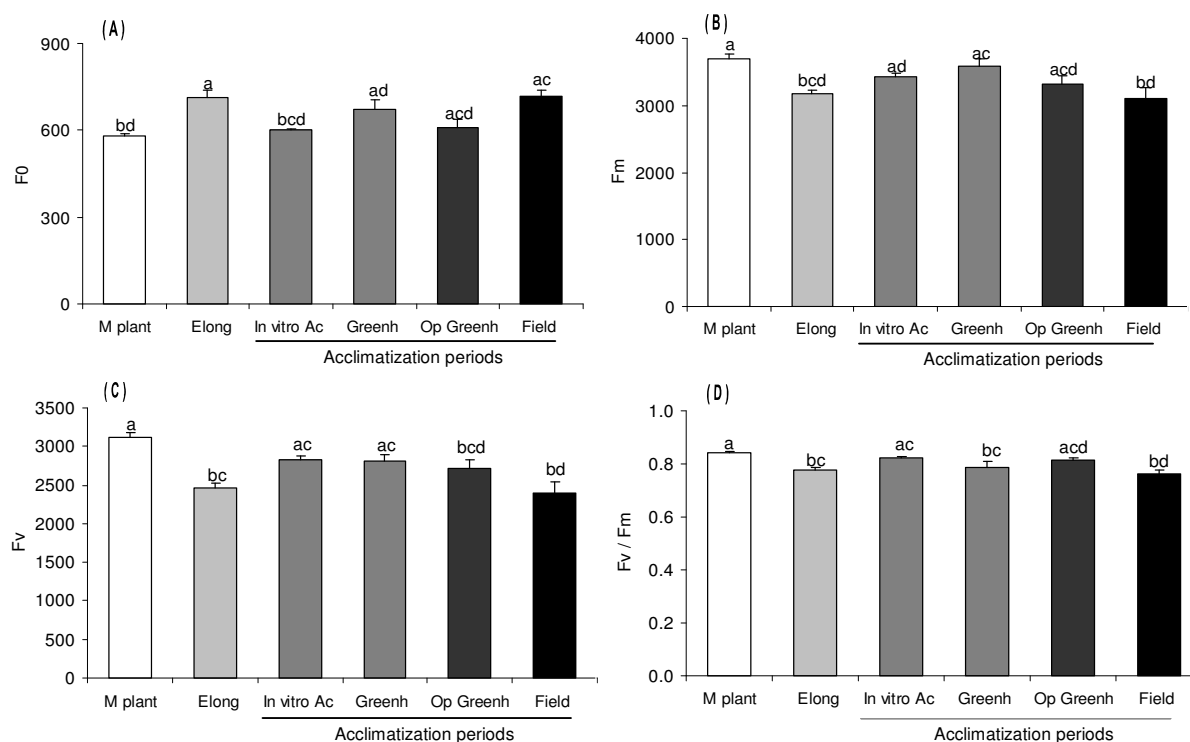


Figure II.5.5 (A-D) – Fluorescence parameters in *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 9$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$. (A): F_0 – basal chlorophyll fluorescence; (B): F_m – maximal chlorophyll fluorescence; (C): F_v – variable component of chlorophyll ($F_v = F_m - F_0$) and (D): ratio F_v / F_m .

Soluble protein content

Soluble protein contents (Figure II.5.6) increased ($P < 0.05$) in leaves of the elongation stage when compared to mother plant, but during the first acclimatization periods (In vitro Ac and Greenh) its levels decreased ($P < 0.05$). In open greenhouse and field acclimatized plants these values slightly increased compared to the two first acclimatization periods (though not statistically different) but close to the values of the mother plant.

Membrane permeability

Relative leakage ratio (Figure II.5.7) did not undergo significant differences ($P > 0.05$) among first stages of micropropagation (Elong, In vitro Ac and Greenh) and between these and mother plant. However when plants were transferred to open greenhouse and to field in Porto Santo Island, membrane permeability increased when related to leaves of the first stages of micropropagation (Elong, In vitro Ac and Greenh) and from mother plant.

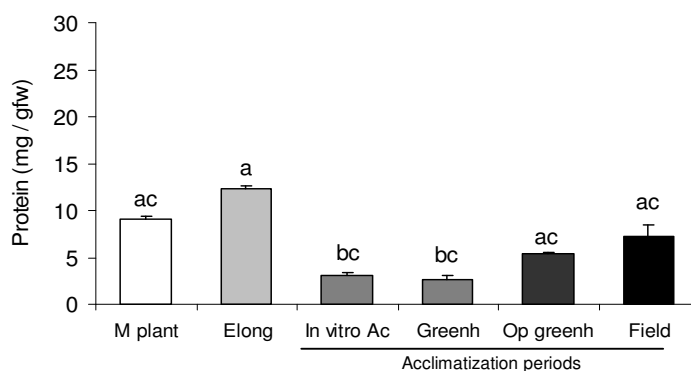


Figure II.5.6 – Soluble protein concentrations in *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

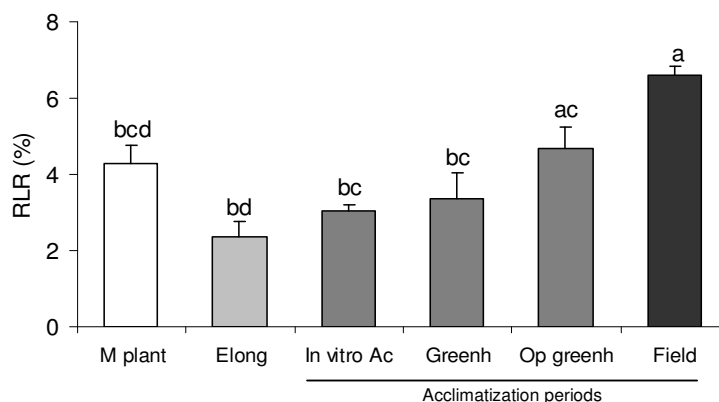


Figure II.5.7 - Membrane permeability (solute leakage) expressed as relative leakage ratio - RLR (RLR= A_{280}/A'_{280} , expressed as percentage) in *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Mineral composition

Macronutrient composition of *Olea maderensis* leaves changed through micropropagation/acclimatization stages (Figure II.5.8-A-J). Magnesium (Mg) and sodium (Na) concentrations were maintained during the first stages of the micropropagation process till open greenhouse condition. However when plants were transferred to field, significant ($P < 0.05$) differences were observed: Mg decreased compared to leaves on elongation stage and on first period of acclimatization; Na content also decreased compared to leaves of the first two acclimatization periods. Phosphorus (P) content was sensibly maintained between mother plant and the subsequent stages of micropropagation, till greenhouse condition. However, P increased in open greenhouse decreasing thereafter.

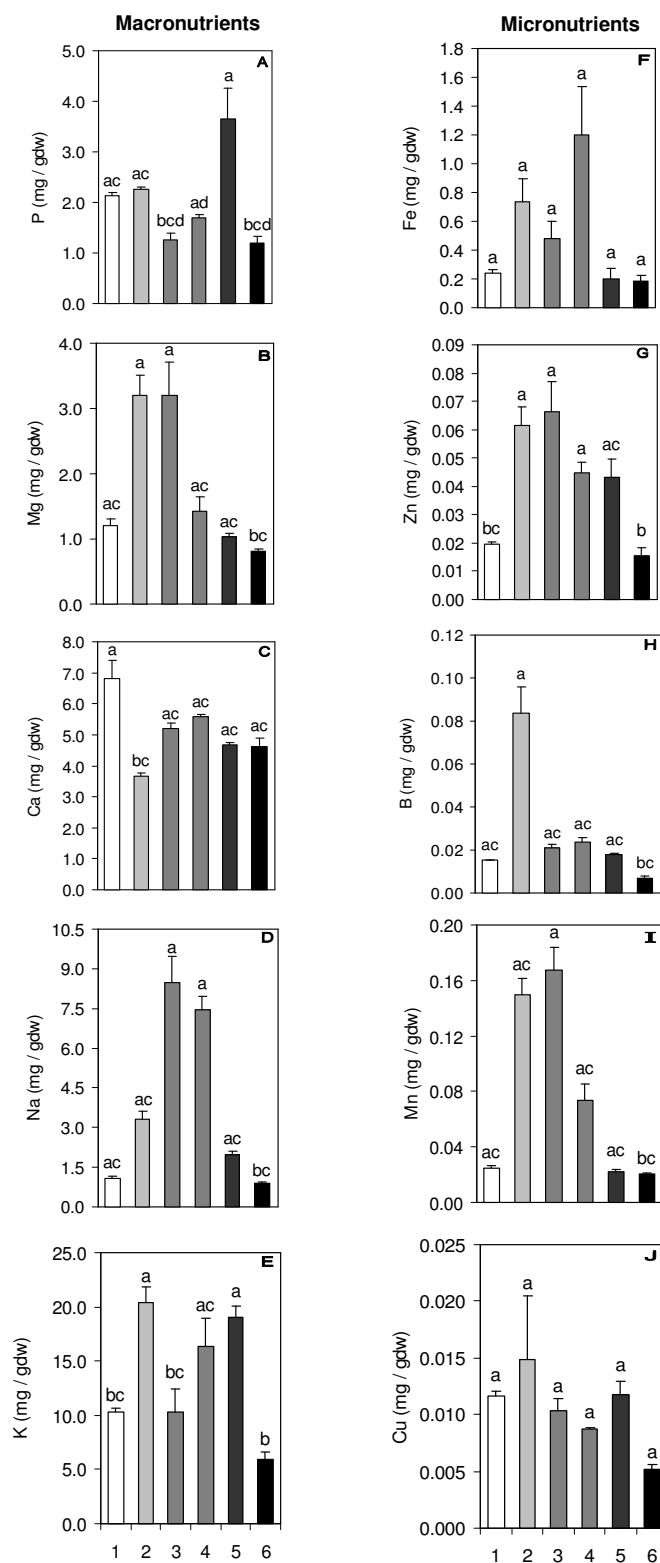


Figure II.5.8 (A-J) – Contents of macronutrients (P, Mg, Ca, Na and K) and micronutrients (Zn Fe, B, Mn and Cu) in *Olea maderensis* OG4 leaves during micropropagation/acclimatization. Values are means \pm SE ($n = 3$). Mean values with the same letter do not differ significantly at $P < 0.05$.

Concerning to calcium (Ca) level it decreased in leaves on elongation stage compared to mother plant, but on the subsequent acclimatization periods its concentration was maintained. Contrarily, potassium (K) level significantly increased in leaves on elongation stage compared to mother plant, decreasing during the first period of acclimatization ($P<0.05$) and being maintained till greenhouse condition. In open greenhouse, K level increased again ($P<0.05$ compared to the in vitro acclimatization period). When plants were transferred to field, K content decreased reaching values similar to those of the mother plant.

Concerning micronutrients levels, iron (Fe) and copper (Cu) did not undergo significant differences through micropropagation stages. However Zinc (Zn), boron (B) and manganese (Mn) contents showed significant differences through micropropagation process. Zn content was higher in leaves from the elongation stage to the open greenhouse period being lower in leaves of both mother plant and field acclimatized plants. B and Mn levels were sensibly maintained ($P>0.05$) thorough the micropropagation/acclimatization process decreasing only after plants transfer to field condition.

II.5.4 Discussion

Recently we described a protocol for large scale micropropagation of the wild olive species *Olea maderensis* and demonstrated that this species needed basal modifications – Fe, Mg, Mn enriched OM medium, named OMG – to improve plant micropropagation rates (Brito et al. 2009). This protocol is presently being used with other genotypes (OG9-OG12) with similar success rates of induction and multiplication, allowing large-scale plant production and long-term cultures maintenance with no apparent phenotypic or genetic variation (see Chapter II.4). As OG4 plantlets were transferred to field in 2006, only this genotype was used to assess the acclimatization process described in this work.

The good quality of the newly formed root system was necessary for a successful acclimatization (97% in greenhouse and 100% in mountain conditions). Also, this five-period acclimatization protocol yields high survival rates, based on the controlled exposure to low relative humidity and high light intensity. The first period (in vitro acclimatization) was very efficient and facilitate transfer to ex vitro conditions. Hazarika (2006) and Pospíšilová et al. (1999) suggest that stimulating autotrophic characteristics under in vitro conditions may improve acclimatization ability and survival rates. During the

whole mountain field acclimatization period (100 plants were transferred on December 2006) all plants survived, and looked morphologically identical, having always an active growth without senescence signals, supporting the conditions established by Hazarika (2006) for a successful acclimatization to occur. In a wild olive acclimatization protocol previously used by our group, which consisted on one step greenhouse transfer, plants survival was much lower (app. 70%) and no plants survived to open greenhouse conditions (Santos et al. 2003).

Due to the hard conditions of the Island, and in order to follow the acclimatization and be able to detect physiological disorders that could be responsible for eventual plant senescence or death, parameters related with photosynthesis, hydric and nutrient status were followed.

In a detailed analysis, and concerning water content, it was observed that values of in vitro-grown leaves (elongation stage) are, as expected, higher than mother plant, once in vitro environments generally keep %RH values close to saturation (Brito et al. 2007b, Malda et al. 1999). In the first acclimatization periods, plants were not under water deficiency, suggesting the development of mechanism(s) to control water loss during transfer of plants to ex vitro. When plants are transferred to field, water loss naturally occurred most probably associated with the dry conditions of the field. Moreover, the possibility that, at this stage, leaves still present histo-anatomic differences from those naturally growing in field (e.g. cuticle thickness) should not be excluded. (Hazarika 2006, Malda et al. 1999, Pospíšilová et al. 1999). Osmolality did not undergo statistically differences during micropropagation/acclimatization meaning that, despite the final water content in the field decreased; the final concentration of osmotically active solutes was maintained, suggesting an efficient osmoregulation ability of plants during the whole acclimatization process.

In vitro plantlets grow generally under low level of light, with plenty of sugar and nutrients to favour heterotrophic growth and in an atmosphere with high %RH (Hazarika 2003). Due to these factors, in vitro plants have low rates of photosynthesis and an incipient photosynthetic apparatus. After transfer to ex vitro conditions, most micropropagated plants develop a functional photosynthetic apparatus, although the increase in light intensity is not linearly translated in an increase in photosynthesis (Amâncio et al. 1999). Despite other studies (e.g. Amâncio et al. 1999, Hazarika 2003) indicate a reduction of the chlorophyll content during in vitro condition, our results shown an increase of chl *a* and chl *b* levels in vitro, which may be explained by the increase of Fe, Mg and Mn levels (essential to photosynthesis) in the OMG medium (Brito et al. 2009). Afterwards acclimatization affected chlorophyll concentration, in particular in chl *b*,

increasing chl *a/b* ratio. Similar results were obtained by Amâncio et al. (1999) with a decrease of chl *b* content and higher values of chl *a/b* ratio when in vitro grapevine plants were exposed to high-light intensity during acclimatization. These data suggest that when plants are transferred to ex vitro conditions at higher light irradiances, photoinhibition or even photooxidation of chlorophyll can occur (Amâncio et al. 1999). This explains the reduction of chl *b* and chl *t* during acclimatization of this wild olive. However leaf blade of acclimatized plants did not revealed any stress signal such as chlorosis or dry spots. Moreover the mean values of chlorophyll content of the field acclimatized plants are close to those of the mother plant, proving that plants are well adapted to field.

The reduction of anthocyanin contents during the two first periods of acclimatization may be explained by the reduced luminosity, lower stress and lower differentiation/age of these leaves with respect to mother plant leaves. Anthocyanin production is a plant response to stressful situations including UVB, drought and nutrient stress (Chalker-Scott 1999) and have a protection role from photoinhibition (Steyn et al. 2002). The apparent increase of antocyanins in field acclimatized plants may suggest a defence strategy of these plants to the high irradiance preventing photoinhibition.

In the elongation stage, leaf F_0 increased, while F_m , F_v and F_v/F_m decreased compared to mother plant. However F_0 significantly decreased in first period of acclimatization, increasing slightly thereafter until field conditions, probably related with a switch to autotrophy condition and suggesting that PSII reaction center (chl *a*) was not deteriorated during last periods of acclimatization. Overall slight increases were observed in the other parameters (F_m , F_v and F_v/F_m), during acclimatization until greenhouse. Pospíšilová et al. (1999) described an increase of fluorescence parameters during de acclimatization of *Nicotiana tabacum* plants, confirming the results obtained to *O. maderensis* in first periods of acclimatization. However, when plants are transferred to field, F_0 increased while the other parameters decreased. The reductions of F_m and F_v are probably due to the new plants' environment, such as high-light intensity, low relative humidity, strong wind and soil composition. It is important to notice that the optimal quantum yield expressed as F_v/F_m ratio was around 0.8. This value is typically found in non-stressed plants and is indicator as optimum to healthy plants (Dodd et al. 1998, Fracheboud 2001, Seon et al. 2000) and it was found for other species (e.g. Oliveira et al. 2009; Santos et al. 2005; Seon et al. 2000). This ratio was maintained stable trough all the process, suggesting the stability of the photosynthetic machinery.

The presence of sugars in the medium may promote mixotrophy, leading to a downregulation of photosynthesis due to feedback inhibition of the Calvin cycle (Amâncio et al. 1999, Premkumar et al. 2001, Van Huylenbroeck et al. 2000). Among photosynthetic

enzymes, Rubisco has deserved much attention since it performs a dual role, as a catalyst in carboxylation of CO₂, and as a major storage protein, being 40–80% of the total soluble leaf proteins (Premkumar et al. 2001). Both roles could be important in overcoming the critical acclimatization phase when the mixo-heterotrophic behaviour of the in vitro plants is shifted to an autotrophic functioning. Protein content decreased during the first acclimatization periods, increasing thereafter to values similar to mother plant. These data support that initial acclimatization is stressful, and part of the degraded protein is probably rubisco, as proposed by Carvalho et al. (2005) for micropropagated grapevines, who recommended the evaluation of this enzyme during acclimatization.

Micropropagation and acclimatization process of *O. maderensis* membrane did not induce solute leakage, once membrane integrity is stable during this time. When plants are transferred to field, relative leakage ratio increased, revealing that these plants suffer some stress during the field acclimatization. Nonetheless, this stress apparently did not compromise plants performance and survival, allowing a good tolerance to the hard conditions of the field (e.g. dry soil, low relative humidity). It is well documented that cell membranes are the first targets of many plant stresses, and the maintenance of their integrity and stability under water stress conditions is a major component of drought tolerance in plants (e.g. Bacelar et al. 2006).

Concerning mineral composition, the values found for *O. maderensis* fit within those already described for in vitro shoots on OMG medium (Brito et al. 2009). Through the micropropagation process, macro and micronutrients contents had a general increase during in vitro. When plants were transferred to the poor soils of the Island (Brito et al. 2007a) the level of nutrients decreased with relation to previous periods of acclimatization, and reached mean values close to those found for mother plant. None of the common visual symptoms of nutrient deficiencies (e.g. small chlorotic leaves, dead areas of leaf tips/leaves, bark lesions) (Clatterbuck 1999) were found in *O. maderensis* during micropropagation and acclimatization process, supporting no nutrient deficiencies and that plants were perfectly adapted to edaphic environment (e.g. magmatic nature soil highly rich in Fe, Mg, and Mn).

In conclusion, micropropagation is presently the only available process for routine and large scale propagation of the endangered species *O. maderensis*. The full integration of this methodology in an ongoing reforestation program of Porto Santo Island, required a successful mountain field transfer protocol. We report here that the acclimatization to Porto Santo mountain conditions of 100 micropropagated plants was fully achieved (100%), and improved plant performance compared to the direct acclimatization protocol previously tested (Santos et al. 2003). The physiological parameters chosen here gave a

global view of plants performance in the adverse conditions of the Island and confirmed that plants are not under severe stress, supporting that this multistep acclimatization protocol supports a large scale plant implantation. This protocol is presently being used for this and other genotypes (OG9-OG12) to maintain the genetic patrimony of this endemic species and simultaneously integrates plants in field, contributing to fight desertification.

Acknowledgments

Authors thank Direcção Regional de Florestas and Secretaria Regional da Educação from Madeira Autonomous Region and Porto Santo Town Hall. Thanks are also due to Mr. L. Silva, Mr. Martinho, Mrs. I. Oliveira and Mr. J. Brito for assistance during acclimatization of plants in the Island and to FCT project (FCT –PNAT/1999/AGR/15011/99) that supported this work.

References

- Amâncio S., Rebordão J.P., Chaves M.M. (1999). Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 31–37.
- Azevedo H., Pinto G., Santos C. (2005). Cadmium effects in sunflower: nutrient imbalances in leaves and calluses. *Journal of Plant Nutrition* 28(12): 2233-2241.
- Bacelar E.A., Santos D.L., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves B.C., Ferreira F., Correia C.M. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* 170: 596–605.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Briccoli Bati, C., Godino, G., Monardo, D., Nuzzo, V. (2006). Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars 'Carolea' and 'Nocellara Etnea'. *Scientia Horticulturae* 109: 173-182.
- Brito G., Santos C. (2009). Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. *Canadian Journal of Forest Research* 39(4): 814-822.
- Brito G., Costa A., Fonseca H., Santos C. (2003). Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* in vitro shoots to osmotic stress. *Scientia Horticulturae* 97: 411-417.
- Brito G., Loureiro J., Lopes T., Rodriguez E., Santos C. (2008). Genetic characterization of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 657-664.
- Brito G., Gonçalves F., Santos C (2007a). Contributo do Projecto REI na avaliação dos ecossistemas de Porto Santo. *Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural)*. Sup. Nº 12: 5-26.
- Brito G., Jardim R., Coelho C., Santos C. (2007b). Micropropagation of a native species of Porto Santo Island as a strategy to combat desertification: wild olive as example. *Silva Lusitana* 15(2): 229-247.
- Carvalho L.C., Esquível M.G., Martins I., Ricardo C.P., Amâncio S. (2005). Monitoring the stability of Rubisco in micropropagated grapevine (*Vitis vinifera* L.) by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Plant Physiology* 162:365-374.

- Chalker-Scott L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70:1-9.
- Clatterbuck W.K. (1999). Nutrient deficiencies in trees. Agricultural Extension Service. University of Tennessee. SP 534-15M-3/99. Accessed 24 April 2008 in: <http://www.utextension.utk.edu/publications/spfiles/SP534.pdf>.
- Dodd I., Critchley C., Woodall G., Stewart G. (1998). Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany* 49:1437-1445.
- Fracheboud Y. (2001). Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. Presentation from the Institute of Plant Sciences ETH, Universitätstrasse 2, CH- 8092 Zürich. Accessed 15 March 2008 in: <http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>.
- Hazarika B.N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85(12):1704-1712.
- Hazarika B.N. (2006). Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108:105–120.
- Lopes T., Capelo A., Brito G., Loureiro J., Santos C. (2009). Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. using nuclear microsatellites. *Trees* 23: 29-36.
- Lucchesini M., Mensuali-Sodi A. (2004). Influence of medium composition and vessel ventilation on in vitro propagation of *Phillyrea latifolia* L. *Scientia Horticulturae* 100: 117-125.
- Malda G., Suzán H., Backhaus R. (1999). In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81:71-87.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659–668
- Oliveira H., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M.A., Santos C. (2009). Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: Emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses. *Environmental and Experimental Botany* 65: 1-10.
- Olmos E., Hernandez J.A., Sevilla F., Hellín E. (1994) Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* 114: 594–598.
- Peixe A., Raposo A., Lourenço R., Cardoso H., Macedo, E. (2007). Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae* 113: 1–7.

- Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., Plzáková Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-497.
- Premkumar A., Mercado J.A., Quesada M.A. (2001). Effects of in vitro tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology* 158: 835-840.
- Rugini E. (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24:123-134.
- Santos C., Brito G., Pinto G., Fonseca H. (2003). In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *madeirensis*. *Scientia Horticulturae* 97: 83-87.
- Santos C., Caldeira G. (1999). Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl. I. Growth rate and osmotic regulation in intact plants and calli. *Journal of Plant Physiology* 155: 769-777.
- Santos C., Fragoeiro S., Phillips A. (2005). Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an in vitro approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae* 103(2): 187-198.
- Seon J.H., Cui Y.Y., Kozai T., Paek K.Y. (2000). Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61:135-142.
- Sims D.A., Gamon J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81: 337-354.
- Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G. (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349-361.
- Van Huylenbroeck J.M., Piqueras A., Debergh P.C. (2000). The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science* 155: 59-66.
- Zacchini M., De Agazio M. (2004). Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum* 48(4): 589-592.
- Zuccherelli G., Zuccherelli S. (2002). In vitro propagation of 50 olive cultivars *Acta Horticulturae* 586: 931-934.

Capítulo II.6

Ongoing studies

Estudos em curso

II.6 Ongoing studies

II.6.1 Current status of *Olea maderensis* micropropagated plants introduced in 'Pico do Castelo'

Micropropagated plants of *Olea maderensis* were transferred to the field (Pico do Castelo) in December 2006 (Capítulo II.5). All plants survived, and look morphologically identical, having an active growth without senescence signals. However during acclimatization, plants have been subjected to various threats such as mammals (e.g. rabbits) that gnaw or clipped young branches and leaves of plants (Figure II.6.1-A,B). Moreover, a lot of gastropods were attached to branches of some of the young plants (Figure II.6.1-C), often a large density of insects was seen in young leaves, mostly near the apical meristem (Figure II.6.1-D,E) and, finally, also spiders were observed colonizing leaves that also presented necrotic spots (Figure II.6.1-F).



Figure II.6.1 – Examples of some interactions between the field introduced micropropagated *Olea maderensis* plants and animals: A, B – mammals; C – gastropods, D, E – insects; F – spiders and G – fence to protect plants against mammals (e.g. rabbits).

The damage caused by rabbits is preoccupying due to the highly extension of plants destruction, not only the micropropagated olives but also other species, as for example, *Dracaena draco* or *Pinus halepensis* between others. Freitas et al. (2007) described the same occurrence in *Pinus halepensis*, referring that rabbits peel the trunk of trees boosting his death. A fence was then applied (Figure II.6.1-G) with success to jeopardize rabbits attacks. With relation to other putative animals' damages (insects, spiders or gastropods) no specific measures were undertaken. However, beyond the apparent damages seen during the first months of acclimatization, the micropropagated plants, in field, grew actively during these two last years, as demonstrated in Figure II.6.2 (A-F). Also, DRF is cultivating other plants, together with the micropropagated plants of *Olea maderensis*, such as *Ceratonia siliqua*, *Dracaena draco* and *Quercus ilex*, in order to increase flora diversity (Figure II.6.2-G,H).



Figure II.6.2 – Micropropagated plants of *Olea maderensis* in 'Pico do Castelo': A –plant with app. 60 cm length (February. 2007, two months after transfer to field); B –plant with app. 90 cm length (August 2007, seven months after transfer to field); C - plant with app. 110 cm length (June 2008, a year and a half after transfer to field); D - plant with app. 120 cm length (December 2008, two years after transfer to field); E – detail of a plant with new shoots (February 2007) and F – detail of a plant with new shoots (December 2008). Other introduced species in 'Pico do Castelo': G – *Quercus ilex* and H – *Ceratonia siliqua*.

II.6.2 Introduction of micropropagated plants in 'Pico do Concelho'

The studies carried out in Part II of this dissertation are a dynamic process that doesn't end with this dissertation. An example of this is the ongoing studies of field acclimatization, in Porto Santo Island. As the micropropagation of new plants has been carried on, we continue having micropropagated plants ready for acclimatization in Porto Santo Island.

Thus, some of these micropropagated plants of *Olea maderensis* ($n = 20$) were introduced in October 2008 in 'Pico do Concelho', within a reforestation program of DRF responsibility. This mountain is highly desertified with poor soils, facing serious problems of erosion (Figure II.6.3-A). The choice of this place (Figure II.6.3-B), with a higher degree of land degradation than 'Pico do Castelo', was a consequence of the success that was obtained with the first acclimatization in field (Pico do Castelo).



Figure II.5.3 – Micropropagated plants of *Olea maderensis* in 'Pico do Concelho'. A – 'Pico do Concelho' with marks of water erosion. B – Hill slope of 'Pico do Concelho' where plants were cultivated (white arrows – micropropagated plants of *O. maderensis* in field with other introduced species; black arrow – water-cistern). C – Cultivated plant (October 2008). D, E – established plants, tree months after transfer to field (with fences to protect against rabbits).

Therefore, it was decided to introduce micropropagated plants in a more degraded land, in order to study the behaviour of these plants in a highly desertified ecosystem, and at the same time to determine their effectiveness in reducing erosion process on hill slopes (Figure II.6.3-C). Until this moment, this population is responding well with the surviving of all cultivated plants (Figure II.6.3-D,E), which shows the good quality of these plants, answering some of the worries raised up by the questionnaires (see Part III).

II.6.3 Future prospects of plants in field

After more than two years of acclimatization in 'Pico do Castelo' and six months in 'Pico do Conselho', all micropropagated plants of *Olea maderensis* survived, and look morphologically identical, having an active growth. This experience clearly demonstrates that this species easily adapts to the local arid conditions. Therefore, this species has potential for being elected, as an alternative/complement to *Pinus*, to combat the erosion process in progress.

Finally, the work presented in Part II of this dissertation, has to be continued through the monitoring, through the years, of (see Part IV):

- a) Plants behaviour in field, until adult age;
- b) Impact that this (cloned) populations may have in local ecosystems (e.g. increase biodiversity);
- c) Effectiveness of plants in reducing erosion process on hill slopes;
- d) Correction of some strategic drifts or decisions in order to maximize plants acclimatization to field.

Also, this is a good example of:

- a) The potentialities that a biotechnology technique may have in a "real scenario", by allowing, in a short-medium term, the (re)introduction of micropropagated plants in a degraded environment;
- b) How to minimize problems that started to appear with the *Pinus* population (e.g. the recent death of a high number of plants due, probably, to low rainfall totals);
- c) Environmental education: Within this strategy activities may be planed to population in general, and a flyer was already designed to be used in future educational activities⁸.

⁸ An example of the designed flyer is attached, Anex I

To conclude, one of the aims of this study, was to preserve the endangered germoplasm of the species *O. maderensis*. Therefore, in order to achieve this objective, in addition to the plants in field, it is also essential to provide some micropropagated plants to important institutions in the Madeira Archipelago where plants will be well cared, namely the Madeira Botanical Garden, 'Quinta das Palmeiras' in Porto Island and to the school (e.g. 'Ecoteca').

II.6.4 Micropropagation studies with other native species

The success achieved with *Olea* sp. is a stimulus for using the same approach for other native species. For example, *Juniperus phoenicea* L. is a native plant of Porto Santo Island and is not efficiently propagated by traditional methods (Brito 2000). For example, and similarly to other *Juniperus* species, *J. phoenicea* does not have a high rate of plant production through seed germination (Ortiz et al. 1998). Therefore, micropropagation should be performed in order to improve the propagation of *Juniperus* species. At University of Aveiro, there are ongoing studies on this species micropropagation. For example, Brito (2000) started micropropagation studies on this recalcitrant species. Following these studies, Loureiro et al. (2007) described for the first time a reliable protocol for *in vitro* regeneration and acclimatization to greenhouse of *J. phoenicea* plants derived from an adult field tree from Porto Santo Island (Figure II.6.4). Further studies in this species must be done in order to optimize the protocol of acclimatization until field conditions.

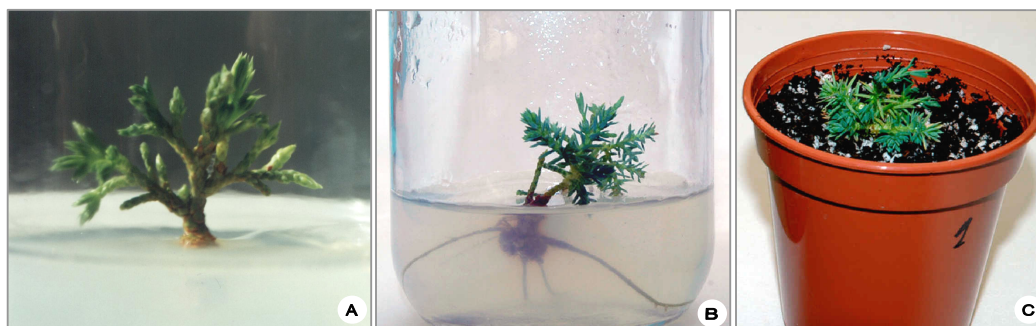


Figure II.6.4 – Stages of micropropagation of *Juniperus phoenicea*: A – shoot culture on OM medium without growth regulators. B – four-month-old plantlet with well developed roots; C – plantlets during acclimatization on peat : perlite (3:2) in greenhouse (adapted from Brito 2000 and Loureiro et al. 2007).

References

- Brito G. (2000). Micropropagação de duas espécies autóctones da Ilha de Porto Santo (*Olea europaea* L. ssp. *maderensis* Lowe e *Juniperus phoenicea* L.) e estudo da resposta de rebentos *in vitro* a stress osmótico (Dissertação de Mestrado em Ciências das Zonas Costeiras), Universidade de Aveiro.
- Freitas S., Sousa P., Fernandes P. (2007). Cinegética na Ilha do Porto Santo: usufruto social da biodiversidade insular. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 33-41. ISSN 0870-3876.
- Loureiro J., Capelo A., Brito G., Rodriguez E., Silva S., Pinto G., Santos C. (2007). Micropropagation of *Juniperus phoenicea* L. adult plants and ploidy stability analyses in micropropagated plants using flow cytometry. *Biologia Plantarum* 51 (1): 7-14
- Ortiz P.L., Arista M., Talavera S. (1998). Low reproductive success in two subspecies of *Juniperus oxycedrus* L. *Internacional Journal of Plant Sciences* 159: 843-847.

PARTE III

**A percepção das comunidades locais relativamente à
valorização do coberto vegetal para minimização
dos processos de desertificação**

III.1 Introdução

III.1.1 Caracterização dos processos de desertificação

A desertificação é um processo complexo e, como tal, é importante clarificar não só os conceitos a ela associados, como também a interligação deste processo com aspectos como a diversidade biológica, a degradação dos solos, ou ainda a qualidade de vida do homem (Sequeira 2005).

O termo “desertificação” começou a ser utilizado no final da década de 40 do século XX para caracterizar as áreas que estavam a ficar semelhantes aos desertos. Durante muito tempo discutiu-se se tal se devia apenas a processos naturais ou também à acção do homem, discussão esta que está longe de ser meramente académica, pois pode e deve influenciar definição de políticas que afectam a vida de todos os residentes da Terra (Lucas 2006).

Em 1992, na Conferência das Nações Unidas sobre o Ambiente e Desenvolvimento no Rio de Janeiro, surge a ideia de preparar uma Convenção de Combate à Desertificação (CCD) nos Países afectados por seca grave e/ou desertificação, particularmente em África. A Convenção foi posteriormente aprovada em 1994 em Paris e ratificada por mais de 50 países, incluindo Portugal. O fenómeno de desertificação é assim definido pela Convenção de Combate à Desertificação das Nações Unidas (UNCCD) como *"a degradação da terra nas zonas áridas, semi-áridas e sub-húmidas secas, resultantes de vários factores, incluindo as variações climáticas e as actividades humanas"*. As zonas referidas, denominadas como "terras secas", dizem respeito às áreas nas quais a precipitação anual varie entre 5% e 65% da evapotranspiração potencial (Louro 2004, Sequeira 2005).

De acordo com a definição UNCCD, importa entender e estabelecer o grau de “degradação” para que uma zona seja considerada desertificada ou sujeita a um processo de desertificação (Silva et al. 2004). Entende-se ainda pela definição da UNCCD a existência de uma série de factores/processos naturais que contribuem para a desertificação (e.g. erosão do solo, declínio da fertilidade do solo, redução da disponibilidade da água, perdas do coberto vegetal, redução da biodiversidade) que conduzem a uma capacidade mais reduzida de manter a vida selvagem e outros organismos ou para produzir produtos úteis para milhões de pessoas (Louro 2004). E por último, se a desertificação resulta não apenas de processos naturais, mas também da sua interacção com as “actividades humanas”, a problemática da desertificação torna-se

ainda mais complexa e serão necessariamente mais exigentes as formas de lhe fazer face (Silva et al. 2004).

Com efeito, o conceito de desertificação da UNCCD, remete para a análise das interações entre três componentes, designadamente o clima e os recursos hídricos, o solo e a vegetação e as práticas sociais no que se refere ao uso do solo e da água (Silva et al. 2004).

Assim sendo, a desertificação resulta de alguma forma da perturbação do equilíbrio entre os três factores referidos que não podem ser vistos de forma dissociada, mas antes estreitamente inter-relacionados (Figura III.1). Esta figura pretende sugerir que o processo de desertificação é algo que tem de ser encarado como estando no cerne da interacção entre os aspectos climáticos, o coberto vegetal e a sociedade, no que se refere à sua utilização dos recursos de água e solo (Louro 2004, Silva et al. 2004).

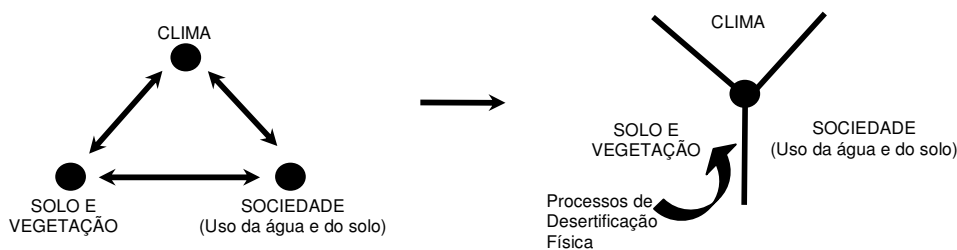


Figura III.1 – Factores presentes nos processos de desertificação física (adaptado de Silva et al. 2004).

Para compreender melhor a relação entre os vários factores presentes nos processos de desertificação é necessário referir as principais causas da desertificação. É corrente encontrar na literatura a distinção entre causas directas e causas indirectas (Silva et al. 2004).

As causas directas são as que afectam directamente a estrutura do solo ou o seu conteúdo em matéria orgânica. De acordo com Silva et al. (2004), as mais comuns são:

- *Sobreexploração agrícola*, incluindo a redução dos períodos de pousio e a expansão para áreas adequadas para a actividade agrícola, conduzindo a uma redução da matéria orgânica do solo, a uma diminuição da sua fertilidade, à degradação da sua estrutura ou à sua maior exposição a processos erosivos.
- *Sobrepastoreio*, incluindo um número excessivo de encabeçamento de gado e a sua expansão para áreas pouco adequadas, conduzindo a uma alteração, empobrecimento da vegetação e redução do coberto vegetal, a uma degradação da estrutura do solo causada pelo pisoteio e a uma intensificação dos processos erosivos.

- *Desflorestação*, incluindo o desmatamento, os incêndios naturais ou causados pelo homem e a conversão em áreas agrícolas ou de pastoreio, com as correspondentes alterações na estrutura e composição do solo, a alteração do balanço hídrico e a ocorrência de solos mais desprotegidos e vulneráveis à erosão hídrica e eólica.
- *Práticas de rega incorrectas*, incluindo medidas de drenagem e de conservação do solo inadequadas, com acumulação de água à superfície e o aumento da evaporação, conduzindo à salinização e alcalinização dos solos, ou a um aumento da erosão hídrica.
- *Ocorrência de secas prolongadas*, que podem conduzir a alterações da estrutura do solo, à alteração do coberto vegetal e a uma maior vulnerabilidade à erosão hídrica e eólica.

As causas indirectas são as que não têm uma incidência directa sobre a estrutura e composição do solo mas que contribuem para desencadear ou intensificar a ocorrência de causas directas e, por esse motivo, contribuem para o processo de desertificação. As mais relevantes são as seguintes (Silva et al. 2004):

- *Sócio-económicas e políticas*, que conduzem a práticas do uso do solo ou da utilização da água que desencadeiam as causas directas referidas. Por exemplo, a sobreexploração agrícola ou o sobrepastoreio têm origem em pressões sociais e demográficas ou numa ausência de planeamento adequado do uso do solo.
- *Aquecimento global do planeta*, devido ao aumento dos gases que provocam o efeito de estufa, promovendo uma subida da temperatura do planeta e consequentemente o aumento das áreas desérticas, com a consequente degradação da estrutura do solo.
- *A seca ou a escassez de água*, para além dos efeitos directos já referidos, podem ter efeitos indirectos na medida em que podem conduzir a uma sobreexploração dos recursos do solo e água.

Numa abordagem mais restrita, relativamente à ocorrência de processos de desertificação, as relações entre a aridez, a seca e a desertificação são importantes, e nem sempre devidamente compreendidas. Neste sentido, importa clarificar estes conceitos e analisar as suas inter-relações (Louro 2004; Silva et al. 2004):

- *Aridez* pode definir-se como um desequilíbrio natural e permanente na disponibilidade de água que consiste na ocorrência de baixas precipitações médias anuais, com grande variabilidade espacial e temporal, resultando num

ambiente geralmente seco onde os ecossistemas são frágeis e possuem baixa capacidade de suporte.

- *Seca* é um fenómeno meteorológico extremo que tanto pode ocorrer em regiões áridas como não áridas. As secas consistem em desequilíbrios naturais e temporários das disponibilidades de água resultantes de precipitação persistente inferior à média, têm duração, severidade e frequência incerta, a sua ocorrência é imprevisível ou difícil de prever, resultando em insuficientes disponibilidades de recursos hídricos que afectam tanto as actividades humanas como a capacidade de suporte dos ecossistemas naturais e antrópicos.
- *Desertificação* é essencialmente um processo induzido pelo homem, em que o desequilíbrio na disponibilidade de recursos hídricos resulta da combinação da degradação da terra, do uso inadequado da terra, da sobreexploração das águas subterrâneas, da ocorrência mais frequente de cheias rápidas, da perda de ecossistemas ripícolas e da deterioração da capacidade de suporte dos ecossistemas.

Em geral, a erosão do solo e a salinidade são processos associados à desertificação, que ocorre em climas áridos, semi-áridos e sub-húmidos, sendo que a seca agrava fortemente os processos de desertificação (Louro 2004).

As regiões áridas e semi-áridas estão sujeitas com mais frequência a situações de escassez de água e, frequentemente, têm recursos em solos mais frágeis. Por este motivo tendem a ser mais vulneráveis à desertificação se ocorrem factores económicos ou sociais que conduzem a um uso excessivo e persistente do solo e da água (Silva et al. 2004).

A seca e a aridez são fenómenos com uma origem natural e que correspondem a uma situação temporária ou permanente, respectivamente. Por outro lado, um uso excessivo do solo ou da água tem uma origem humana e uma natureza em princípio temporária, embora possa ocorrer uma situação permanente de escassez daqueles recursos que configura uma situação de desertificação. Uma forma de sistematizar a relação entre as causas naturais e originadas pelo homem, por um lado, e a ocorrência de fenómenos temporários ou permanentes associados à escassez de água e degradação de solo, por outro lado, está representada na Figura III.2 (Silva et al. 2004).

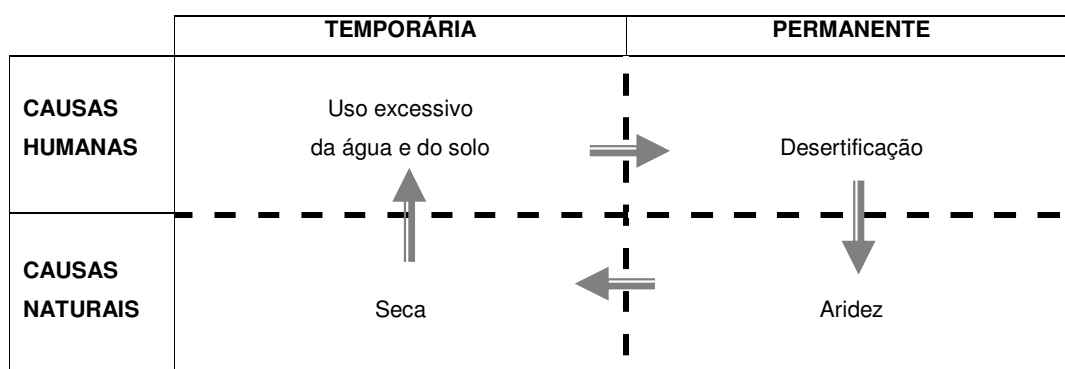


Figura III.2 – Principais características associadas à aridez, seca e desertificação e representação do ciclo dinâmico que relaciona aridez com desertificação (adaptado de Silva et al. 2004).

As causas naturais e humanas e as ocorrências temporárias e permanentes têm uma natureza dinâmica e interactiva. A figura III.2 mostra claramente esta relação, verificando-se que uma situação de aridez é particularmente vulnerável à ocorrência de secas o que consiste num processo exclusivamente natural. As secas, contudo, induzem formas de utilização do solo e da água que levam a situações de sobreexploração e *stress* daqueles recursos que podem conduzir a situação de desertificação. Por sua vez, a desertificação pode contribuir para agravar a situação de aridez desencadeando um ciclo vicioso em que, pela interacção de processos naturais e antrópicos, as condições de degradação se agravam e ganham um carácter permanente (Silva et al. 2004).

Torna-se, assim, claro que a compreensão dos processos de desertificação não pode ser alcançada unicamente no plano dos processos físicos. A componente sócio-económica é essencial para que se entendam os motivos que estão na origem desses processos e as razões que contribuem para o seu agravamento.

Se uma abordagem integrada dos aspectos físicos e sócio-económicos é essencial para a compreensão da desertificação, maior ainda é a sua importância para estabelecer medidas que combatam a desertificação ou pelo menos a mitiguem.

III.1.2 A desertificação em Portugal

Portugal apresenta extensas áreas com moderada a alta susceptibilidade à desertificação, devido essencialmente às condições climatéricas, geológicas e do tipo de cobertura vegetal, mas também em resultado do modelo de ordenamento do território (LPN 2008). Tal facto aponta para riscos reais e potenciais de degradação dos solos

resultado da conjugação de práticas culturais agrícolas e / ou florestais incorrectas, com condições severas de aridez e episódios recorrentes de seca (Louro 2004).

As regiões mais expostas a este complexo de factores situam-se na faixa inferior do Norte, Beiras, Alentejo, e Algarve, diferenciando-se, contudo, condições de maior ou menor agravamento dos aspectos críticos. De entre estes chamam particularmente a atenção o peso relativo das áreas de floresta, agricultura e incultos e respectivas tendências de evolução, sem esquecer as dinâmicas demográficas associadas.

Tendo sido identificadas pela Convenção as grandes particularidades dos fenómenos ligados à desertificação na Região Mediterrânica Norte, dita Região Anexo IV (Anexo de Implementação Regional para o Norte do Mediterrâneo) e após desenvolvidos esforços por parte de Portugal, Espanha e Grécia afim de serem incluídos neste Anexo (uma vez que são os países mais afectados), verifica-se assim, a integração de Portugal, em 1994 (Louro 2004).

Um dos mais importantes instrumentos para a implementação da UNCCD são os Programas de Acção Nacionais e Regionais, que os países membros têm obrigação de desenvolver. Assim, Portugal dispõe actualmente de um Programa de Acção Nacional de Combate à Desertificação (PANCD), aprovado pelo Conselho de Ministros em Junho de 1999. Foi elaborado dentro do espírito imposto pela Convenção de Combate à Desertificação, que é o de fazer participar as populações afectadas na identificação dos problemas que lhes dizem respeito, bem como na procura e adopção de soluções (Louro 2004, Lucas 2006).

O PANCD define vários objectivos estratégicos, a saber: conservação do solo e da água, fixação da população activa nos meios rurais, recuperação das áreas afectadas, sensibilização da população para a problemática da desertificação, consideração da luta contra a desertificação nas políticas gerais e sectoriais (Louro 2004).

III.1.3 Caso particular da Ilha de Porto Santo

O grave problema de degradação do solo/desertificação que assola a Ilha de Porto Santo, é reconhecido desde há longa data, como se pode compreender através de um excerto do livro do Eng.^o Eduardo de Campos Andrada, aquando da chegada de Engenheiros Silvicultores e funcionários da Direcção-Geral dos Serviços Florestais à Ilha em 1952: *“Com efeito, não podendo ficar indiferentes em face de tão impressionante escassez do revestimento do solo e da intensidade dos fenómenos erosivos que se constata no Porto Santo, juntámos o nosso grito de alarme ao de tantos outros que se*

têm esforçado por minorar esses graves inconvenientes. ... E de facto em nenhuma outra parte deste Arquipélago será tão urgentemente necessária a intervenção dos Serviços Florestais, no sentido de se constituírem arvoredos que defendam o solo da erosão e venham melhorar as condições de vida dos habitantes da Ilha.” (Andrada 1990, p. 163)

Nesta transcrição é possível verificar que uma das causas atribuída à grande degradação dos solos é a escassa vegetação que os reveste, tendo como principal consequência os processos erosivos intensos.

De facto, as causas que estiveram na origem do processo de desertificação ocorrido na Ilha de Porto Santo, e que se foi agravando ao longo do tempo, para além dos processos naturais, deveu-se em grande escala a causas humanas. De entre os processos naturais destacam-se o facto da Ilha ser uma região semi-árida, e as secas que se caracterizam pela ocorrência de níveis de precipitação abaixo dos normais. Estas, quando registadas por um longo período de tempo, afectam o normal desenvolvimento da vegetação, fragilizam o recurso solo e, diminuem as produções agrícolas (Neves et al. 2008).

As actividades humanas que contribuíram para a desertificação na Ilha estão sobretudo, ligadas à desflorestação através dos cortes abusivos de árvores, que levaram à destruição quase completa do coberto vegetal, as más práticas agrícolas, como são exemplo das lavouras profundas e contínuas, situações em que as vertentes foram lavradas no sentido do declive, e a monocultura cerealífera no passado, que levou à perda de nutrientes do solo e ao seu esgotamento. Também as actividades ligadas à pecuária terão causado uma delapidação do coberto vegetal e uma degradação intensa, como o sobrepastoreio, o que resultou no aparecimento de regos, que favoreceram a escorrência superficial, e a compactação do solo pelo pisoteio excessivo do gado. Um outro factor, que contribuiu para o acelerar do processo, foi ainda a proliferação do coelho bravo (Quintal 2001, Filipe 2007). A Figura III.3 mostra a degradação e exaustão dos solos a que a Ilha chegou na década de 50 do século XX, em comparação com aspectos de desertificação que se verificam actualmente nalgumas zonas da Ilha.

Verificou-se assim, ao longo dos tempos, que os processos naturais em interacção com os processos antropogénicos, desencadearam um processo de desertificação e degradação da terra, que se agravou e ganhou um carácter permanente.

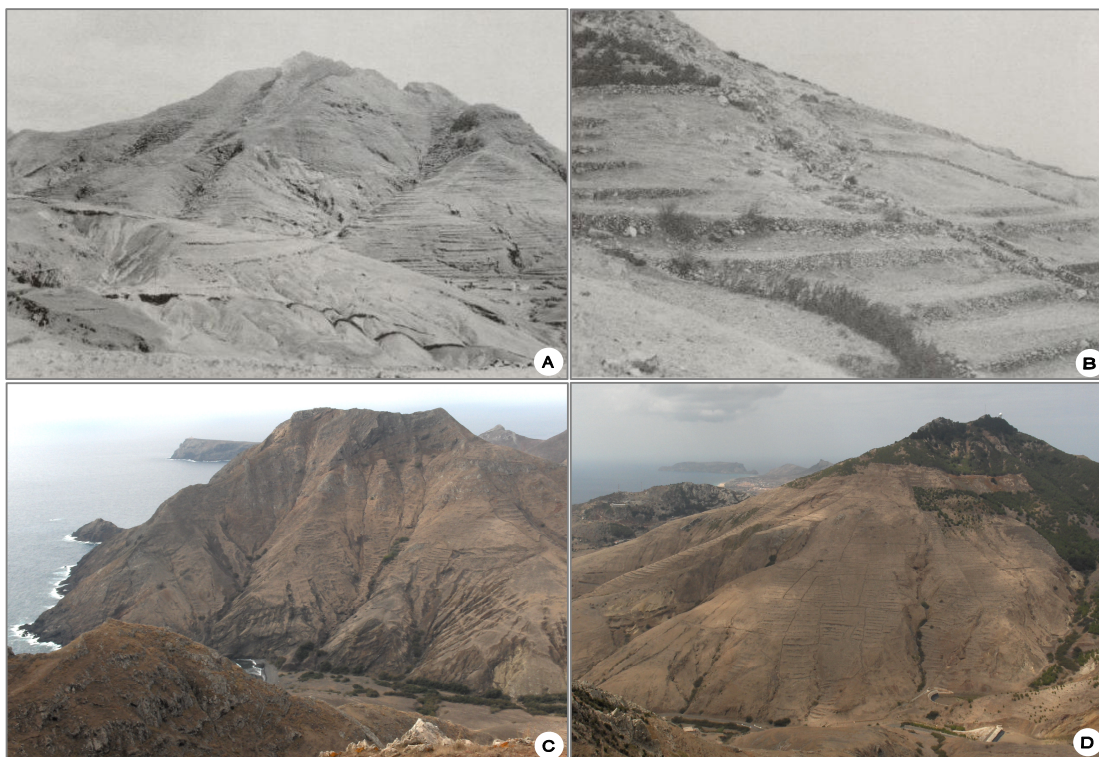


Figura III.3 – Aspectos comparativos da degradação do solo/desertificação na Ilha de Porto Santo na década de 50 do século XX e actualmente. A) Exemplo da desertificação e exaustão do solo nas encostas do Pico Branco (década de 50, adaptado de Andrada 1990); B) Aspecto de antigos terrenos de cultura cerealífera na parte noroeste do Pico do Castelo, verificando-se a aridez e progressivo esgotamento do solo (década de 50, adaptado de Andrada 1990); C) Exemplo da desertificação e exaustão do solo nas encostas do Pico do Concelho (Agosto de 2007); D) Aspecto de antigos terrenos de cultura cerealífera nas encostas do Pico do Facho e esforço de reflorestação no cume do Pico (Agosto de 2007).

Apesar dos esforços desenvolvidos para combater o processo de desertificação na Ilha de Porto Santo, da responsabilidade do Governo Regional da Madeira, essencialmente a florestação de algumas áreas e medidas de correcção torrencial das linhas de água, existem factores associados responsáveis por agravar a desertificação, nomeadamente: a) os processos erosivos, como a erosão hídrica, devido à ocorrência pontual durante o Inverno de precipitação muito intensa, o que agrava fortemente a estrutura do solo, por acção de uma lavagem superficial intensa e, a erosão eólica que também se encarrega de destruir a fina camada de solo, ajudando a trazer à superfície a rocha-mãe; b) a actual situação de monocultura com plantas exóticas, que, embora desempenhe um excelente papel na minimização da degradação do solo, não promove o aumento considerável da diversidade biológica; c) a degradação da água de superfície e a redução da recarga de aquíferos (ou águas subterrâneas), devido principalmente à

destruição do coberto vegetal e os consumos excessivos de água (turismo e agricultura - irrigação), cujas águas muitas vezes contêm sais em excesso, originando a salinização dos solos. Existem ainda outros factores, que se fazem sentir na Ilha, que embora não se encontrem directamente integrados nesta abordagem, também são influentes nos processos de degradação do solo, nomeadamente: a) a exploração de pedreiras para extracção de inertes; b) a degradação da água e do solo pela poluição (deposição de resíduos a céu aberto) c) e a impermeabilização dos solos pela criação de infraestruturas, equipamentos e urbanização dos mesmos.

Considerando estes aspectos, verifica-se a necessidade de continuar a desenvolver esforços para combater os processos de degradação do solo/desertificação nalgumas áreas da Ilha de Porto Santo. Como já referido, o excelente trabalho que tem vindo a ser desenvolvido por parte do Governo Regional da Madeira, deverá ser continuado de forma a minimizar os problemas de degradação biofísica que ainda hoje se fazem sentir na Ilha.

Neste contexto, a identificação e avaliação do “status” da degradação da terra e da desertificação na Ilha são essenciais de modo a serem tomadas decisões conscientes, no futuro, para o uso sustentável do solo.

A erosão generalizada do solo e o declínio da sua fertilidade podem ser importantes restrições para melhorar a produtividade das zonas degradadas, e estão também intimamente relacionados com escoamento da água, evaporação e transpiração. Deste modo, os métodos tradicionais utilizados para o combate à desertificação, tentam, em geral, o melhoramento das condições do solo com a melhoria da retenção da água (Louro 2004). Recomenda-se, assim, especial atenção à reflorestação e aos sistemas agrícolas com vista à conservação e manutenção da fertilidade do solo. Louro (2004) valoriza a combinação do conhecimento tradicional (e.g. métodos tradicionais) com tecnologias e técnicas modernas, no planeamento de estratégias de combate à desertificação. A reflorestação com espécies indígenas e plantas herbáceas, e a utilização de plantas com requisitos mínimos de água poderá melhorar as propriedades do solo (e.g. retenção da água, teor de nutrientes, teor de matéria orgânica e actividade microbiológica) e assim contribuir mais eficazmente para a recuperação do equilíbrio natural dos ecossistemas (Louro 2004).

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação vai, assim, de encontro ao proposto por Louro (2004) uma vez que se pretendeu utilizar estratégias para valorizar o coberto vegetal como forma de minimizar o processo de desertificação na Ilha de Porto Santo, cujo principal objectivo é introduzir nos programas de reflorestação, em curso, espécies indígenas e/ou espécies adaptadas às condições edafo-climáticas da ilha, com vista à recuperação do equilíbrio desses ecossistemas. Para isso, utilizaram-se

metodologias mais recentes (micropagação) em combinação com os métodos tradicionais (e.g. propagação vegetativa e sementeira), esperando assim, conseguir obter bons resultados no processo de combate à desertificação.

Uma outra medida importante será avaliar até que ponto a reflorestação de algumas áreas da Ilha, será eficiente na minimização da degradação da terra. Num estudo desenvolvido por Durán Zuazo et al. (2006), para a conservação do solo através da cultura de plantas, estes autores monitorizaram as águas de escorrência e a erosão do solo, de modo a perceberem a eficiência da vegetação na protecção do solo contra a erosão em comparação com solos desnudados. Os resultados do estudo mostraram que mesmo utilizando plantas de porte médio, estas tiveram um efeito significativo na redução da degradação do solo.

Um outro aspecto importante que pode conduzir ao encontro de soluções para combater o processo de desertificação, relaciona-se com o modo como a população vê e avalia estes processos de degradação do solo/desertificação no seu quotidiano. A participação através do envolvimento do público, poderá assim melhorar a qualidade das decisões, reconhecendo os agentes e o público em geral como fonte legítima de conhecimento e ideias para as decisões. Permite também incorporar valores diversos nos processos de decisão já que existem grandes diferenças entre técnicos, políticos, cidadãos e investigadores, na percepção das realidades (Santos et al. 2004).

III.1.4 A participação pública e a percepção na procura de soluções para combater a desertificação

Na última década tem estado na “ordem do dia” a importância da participação pública enquanto orientação de políticas ou como processo educativo para a resolução e minimização de problemas ambientais.

Desde 1992, na sequência da Conferência das Nações Unidas para o Ambiente e Desenvolvimento, que o papel da educação, nas suas vertentes formais e informais, é considerado fundamental para o desenvolvimento de uma participação pública efectiva nos processos de tomada de decisão. Um dos resultados mais importantes desta conferência foi a Agenda 21 que *“...reconhece que para lidar com o fenómeno de mudança ambiental global, é necessário planear estratégias adequadas para estimular o sentido de responsabilidade e envolver as pessoas na procura de soluções.”* (Pinho et al. 2004).

Segundo Leeuw (1999), citado por Landeiro et al. (2004), o grau de envolvimento da população na desertificação ou na degradação da terra pode ser traduzida por duas categorias de agentes: os “actores” e os “observadores”. Os “actores” podem ter um papel re-activo (como vítima da degradação) ou um papel pró-activo (como factor/causa de degradação), como já exposto anteriormente. Os “observadores”, refere-se ao modo como a população vê e avalia estes processos de degradação/desertificação no seu quotidiano. O papel da população, enquanto observadora de desertificação, tem sido remetido para segundo plano, como frequentemente sucede com as dimensões subjectivas de problemáticas consideradas objectivas. No entanto, a “relevância da degradação” está imbuída de uma dimensão perceptiva, ou seja, o que é “degradação” num determinado contexto cultural, não o é necessariamente num contexto distinto, o que é “relevante” numa determinada sociedade, pode ser secundário perante outras questões consideradas prioritárias noutra sociedade (Landeiro et al. 2004).

O conceito de percepção ambiental foi introduzida nos anos 60 do século XX como forma de conceptualizar o modo como a informação sobre o ambiente é adquirida, interpretada e utilizada no processo de decisão, considerando que as decisões são tomadas também em função da “imagem” do ambiente/espço e que esta difere de indivíduo para indivíduo, com base nas suas experiências pessoais e do meio onde se insere (Landeiro et al. 2004).

A importância da percepção em processos de desertificação tem sido reconhecida (Heathcote 1980). O fenómeno é passível de ser enquadrado ao nível da percepção do risco, constituindo esta uma ameaça para a vida e vivência das populações. Assim, perante o perigo, as sociedades têm reacções e comportamentos próprios, que dependem das suas características sócio-económicas, históricas e políticas, como da própria natureza dos problemas que originam as situações de risco. Basicamente, pode referir-se que as atitudes e representações face ao risco são socialmente determinadas e, por isso mesmo, localizadas num determinado contexto social e político (Coelho et al. 2004).

Segundo Landeiro et al. (2004), o risco da desertificação reveste-se de características particulares que devem ser tidas em conta na sua análise: a) é a conjugação de um risco natural (e.g. seca) e de um risco tecnológico (e.g. práticas agrícolas); b) não se expressa como catástrofe pontual (como as cheias ou os sismos); c) tem efeitos cumulativos ao longo do tempo; d) os efeitos não são visíveis imediatamente (por vezes só na geração seguinte); e e) a recuperação dos efeitos é ainda mais lenta que a degradação (por vezes só alcançáveis em gerações seguintes). Deste modo, a percepção da ocorrência dos eventos relacionados com a desertificação (seca, grau de aridez, desflorestação, práticas

agrícolas, erosão, etc.) irão variar em função da frequência com que ocorrem e em função dos seus efeitos afectarem um recurso de base para um uso dominante (Landeiro et al. 2004).

Considerando estes aspectos, o modo como as populações expostas percebem o risco constitui um aspecto fundamental, quer para a análise dos comportamentos face à ocorrência de eventos relacionados com a desertificação, quer para a avaliação do conhecimento face à magnitude, causas e consequências do próprio risco. Destaca-se, assim, a importância do grau de envolvimento e de participação das comunidades locais no sucesso da aplicação das medidas de gestão e de mitigação, sendo este aspecto determinante na análise de problemas e no desenvolvimento de propostas, criando consensos e compromissos no processo de tomada de decisão (Coelho et al. 2004).

A forma como este processo de participação das comunidades locais deve ser desenvolvido pode enquadrar-se, segundo Lima e Pato (2006), no contexto da democracia participativa, em que é possível identificar três dimensões fundamentais na análise do envolvimento do público, e em função das quais podemos avaliar o grau de participação pública num determinado domínio de actividade:

- *Informação*: representa um nível básico de envolvimento do público. Trata-se de um processo comunicacional unidireccional, normalmente dirigido das entidades técnicas e administrativas competentes para os cidadãos, visando a divulgação de factos (e.g. sessões de esclarecimento sobre um projecto ou a disponibilização de informação sobre determinado assunto).
- *Consulta*: representa um processo comunicativo em que se procura auscultar os cidadãos em geral, ou as partes interessadas, sobre uma questão ou processo particular. Há várias formas possíveis de consultar o público: sessões de consulta pública, inquéritos, sessões de trabalho, entrevistas, etc.
- *Envolvimento Activo*: representa um processo de envolvimento de cidadãos ou entidades nos processos de planeamento, tomada de decisão ou gestão. No caso de ser necessário tomar uma decisão final, a posição das partes interessadas deverá ser integrada nessa decisão. No caso de se tratar de um processo de gestão / administração, deverá existir uma partilha de responsabilidades entre as partes interessadas. O envolvimento activo pode assumir diferentes formas, como a pertença a comissões de gestão ou a emissão de pareceres ou comentários durante uma avaliação de impacto ambiental.

Nesta investigação o envolvimento do público foi feito através da *consulta* (inquéritos e entrevistas), e pretendeu-se analisar o conhecimento/percepção da sociedade civil

sobre o fenómeno da desertificação e o estado actual da vegetação na Ilha de Porto Santo, sendo que, a avaliação das possíveis respostas, é de extrema importância para a elaboração de estratégias de mitigação e prevenção.

III.1.5 Objectivos da investigação

O objectivo geral desta investigação foi:

- Avaliar a percepção da comunidade relativamente ao fenómeno da desertificação e a implementação de medidas mitigadoras onde se inclui o recurso a estratégias alternativas de valorização do coberto vegetal, envolvendo a biotecnologia (e.g. micropropagação de plantas) para a minimização dos processos de desertificação em curso.

Os objectivos específicos foram os seguintes:

- a) Compreender as visões da população (residente, visitante e entidades/especialistas) sobre a problemática da desertificação, através do levantamento da percepção do processo, ao nível da caracterização do problema da desertificação (delimitação do conceito), da identificação das causas e consequências do processo, das soluções preconizadas e da atribuição de responsabilidades.
- b) Compreender as visões da população (residentes, visitantes e entidades/especialistas) no que diz respeito à valorização do coberto vegetal como medida importante para minimizar o processo de desertificação, através do levantamento da percepção quanto ao conhecimento das espécies vegetais nativas da Ilha de Porto Santo, à caracterização do coberto vegetal, às medidas tomadas para preservação do coberto vegetal, e ainda o grau de conhecimento quanto à aplicação de métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas), para ajudar o processo de reflorestação.

III.2 Metodologia desenvolvida

III.2.1 Área de estudo e definição do problema

A área de estudo escolhida foi a Ilha de Porto Santo (caracterização geral da Ilha – Parte I). Neste âmbito, foi feita a formulação do problema que se relaciona com os seguintes aspectos presentes na Ilha:

- a) apresenta características de uma região semi-árida;
- b) apresenta níveis de precipitação baixos;
- c) sofreu desertificação/degradação dos solos ao longo do tempo;
- d) sofreu devastação do seu coberto vegetal;
- e) ocorrência de processos erosivos que intensificam ainda mais a desertificação;
- d) pressão turística sobre o território.

Considerando estes aspectos, foi definido como tema central deste estudo: a valorização do coberto vegetal para minimização do processo de desertificação, enquanto processo de degradação do solo.

Neste sentido, procedeu-se à construção de inquéritos por questionário, de modo a fazer a recolha do máximo de informação, tanto da população residente como visitante, quanto ao conhecimento e grau de importância destes problemas relativamente ao local onde vivem ou que escolheram como destino de férias. Foi ainda elaborado um inquérito por entrevista para aplicação às entidades locais e especialistas.

III.2.2 Elaboração dos instrumentos de recolha de informação

A recolha de informação consistiu na utilização de três instrumentos complementares:

- Inquérito por questionário aos residentes (IQR)⁹;
- Inquérito por questionário aos visitantes (IQV)¹⁰;
- Inquérito por entrevista (IE)¹¹ a entidades locais e regionais e a especialistas, com intervenção na área de estudo.

A estratégia de aplicação dos IQR, IQV e IE foi planificada, segundo o esquema apresentado na Figura III.4.

⁹ O guião do IQR é apresentado em Anexo, Anexo II

¹⁰ O guião do IQV é apresentado em Anexo (versão Portuguesa e Inglesa), Anexo III

¹¹ O guião do IE é apresentado em Anexo, Anexo IV

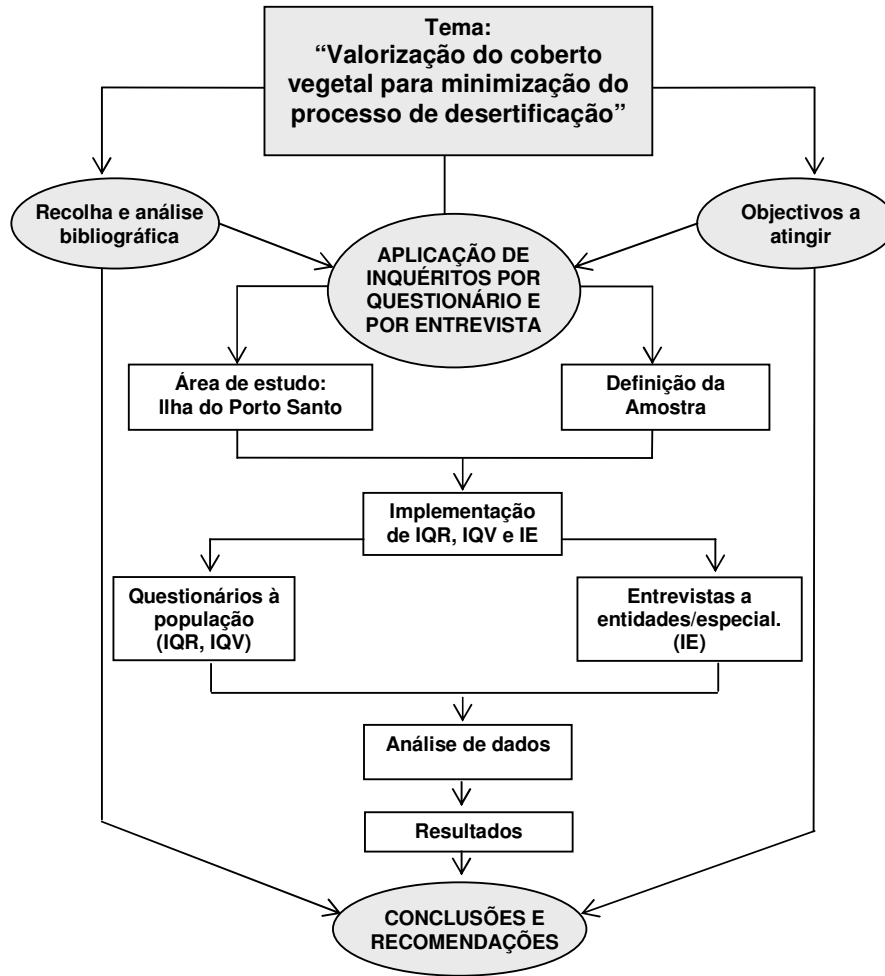


Figura III.4 – Planificação esquemática da aplicação de Inquéritos por questionário e por entrevista à população (residentes, visitantes e entidades locais) da Ilha de Porto Santo (adaptado de Brito et al. 2004).

Foram construídos dois inquéritos, um mais extenso para aplicação à população residente e outro mais curto para aplicação à população visitante, o qual foi traduzido numa versão em língua inglesa. Ambos os inquéritos foram divididos em três grandes grupos de questões.

O primeiro grupo corresponde à caracterização dos indivíduos, onde se pretendeu conhecer as variáveis socioeconómicas e discernir quais as que mais contribuem para o entendimento e comportamento dos inquiridos face ao problema em questão. O segundo grupo pretendeu apreender qual a percepção do processo de desertificação/degradação do solo por parte dos inquiridos, através de questões relacionadas com a caracterização do problema da desertificação (delimitação do conceito), a identificação das causas e consequências do processo, as soluções preconizadas e a atribuição de responsabilidades, uma vez que é reconhecido que a Ilha de Porto Santo sofre estes

fenómenos. No segundo grupo pretendeu-se compreender as visões da população no que diz respeito à valorização do coberto vegetal como medida importante para minimizar o processo de desertificação, através do levantamento da percepção quanto ao conhecimento das espécies vegetais nativas da Ilha de Porto Santo, à caracterização do coberto vegetal, às medidas tomadas para preservação do coberto vegetal, e ainda qual o grau de conhecimento quanto à aplicação de métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas), para ajudar o processo de reflorestação.

Paralelamente, realizaram-se inquéritos por entrevista, no sentido de conhecer a perspectiva de algumas entidades locais e regionais com intervenção na área de estudo e ainda de alguns especialistas. A estrutura da entrevista visou a identificação da relevância que as entidades e os especialistas atribuem a um conjunto de questões sobre a temática da desertificação e valorização do coberto vegetal na Ilha de Porto Santo, nomeadamente:

- a) Identificação da Ilha como área sujeita à desertificação;
- b) Causas da desertificação;
- c) Acções/medidas para melhorar a situação;
- d) Caracterização do coberto vegetal;
- e) Utilização de novas metodologias (e.g. micropropagação de plantas) para minimização do processo de desertificação;

III.2.3 Selecção da amostra

A escolha da população residente a inquirir, foi definida por amostra estratificada por quotas, com base em critérios associados à dimensão populacional (sexo, estrutura etária, situação económica e o nível de escolaridade), segundo os Censos 2001 da Região Autónoma da Madeira. Deste modo, foi calculada uma percentagem de 5 % da população residente em Porto Santo, com mais de 15 anos, para os diferentes critérios (INE 2001) de modo a definir o número de inquéritos a aplicar. A definição da amostra por este processo permite que todos os membros da população tenham a mesma probabilidade de fazer parte da amostra para que esta seja representativa de toda a população de Porto Santo.

A tabela III.1, mostra a distribuição real da população residente com mais de 15 anos para cada um dos critérios seleccionados (INE 2001) e o cálculo de 5% da população que corresponde ao número de inquéritos a aplicar em cada critério. Apresenta-se ainda o número de IQR realizados, e como se pode observar, houve a tentativa de aproximar o nº

de IQR à distribuição real da população de modo a reproduzir um modelo fiel da realidade. Assim o número total de inquéritos obtidos foi 206. A aplicação de inquéritos decorreu durante os anos de 2005 e 2006.

Tabela III.1 – Definição da amostra para a aplicação dos IQR, baseada nos Censos 2001 da Região Autónoma da Madeira (RAM) (INE. 2001) e número IQR respondidos.

Sexo	Total de Residentes (Censos 2001)	Definição da amostra (5%)	Nº IQR
Masculino	1826	91	89
Feminino	1853	93	117
Total Pop. Residente > 15 anos	3679	184	206
Idade			
15 - 19	444	22	37
20 - 29	708	35	48
30 - 39	776	39	54
40 - 49	671	34	33
50 - 59	411	21	20
60 - 69	395	20	11
70 ou mais	274	14	3
Total	3679	184	206
Situação Económica			
Empregada	2088	104	125
Desempregada	124	6	6
Estudante	393	20	51
Doméstica	396	20	15
Reformado	519	26	7
Incapacitado perante o trabalho	58	3	2
Outras	101	5	0
Total	3679	184	206
Nível de Escolaridade			
Nenhum	627	31	6
1º CEB	1522	76	36
2º CEB	610	31	5
3º CEB	676	34	29
Secundário	723	36	92
Médio=Bacharelato	12	1	3
Superior	304	15	35
Total	4 474	224	206

No que diz respeito à amostra relativa aos visitantes à Ilha de Porto Santo, optou-se por fazer uma amostragem aleatória, uma vez que a amostra não obedece a critérios associados às características objectivas dos visitantes (i.e. àquelas que se referem ao sexo, à idade, à escolaridade, etc.), já que não existe qualquer tipo de informação disponível sobre estes indivíduos.

Deste modo, a estratégia utilizada para a aplicação de inquéritos aos visitantes foi, a sua distribuição por todos os estabelecimentos hoteleiros (hotéis, pensões, residenciais) existentes na Ilha, durante período balnear (meses de Junho a Setembro), uma vez que

este é o período do ano de maior afluência de visitantes à Ilha. A aplicação de inquéritos decorreu durante os anos de 2005 e 2006.

Para além dos inquéritos distribuídos nos estabelecimentos referidos, foram ainda distribuídos alguns inquéritos, pontualmente, em cafés/bares, esplanadas, em passeios turísticos, etc. Deste modo, o número de inquéritos distribuídos nos estabelecimentos hoteleiros rondou os cerca de 350 em versão portuguesa e cerca de 200 em versão Inglesa, tendo-se obtido no final, um total de 98 inquéritos respondidos. Relativamente aos inquéritos realizados pontualmente, dos 75 inquéritos distribuídos, obteve-se 39 respondidos. Estes valores perfazem um total de 137 IQV¹².

Os dados empíricos dos IQR e IQV foram analisados, quanto às frequências absolutas e relativas, recorrendo ao programa informático SPSS 15,0 – Statiscal Package for the Social Sciences.

¹² A estratégia de distribuição e aplicação dos IQV pelos vários estabelecimentos hoteleiros e distribuição pontual e o número de inquéritos respondidos, é apresentada em anexo, Anexo V.

III.3 Resultados

III.3.1 Caracterização dos inquiridos – Residentes da Ilha de Porto Santo

A Ilha de Porto Santo encontra-se dividida por vários lugares, sendo que a distribuição dos IQR por lugar de residência, encontra-se apresentada na Figura III.5.

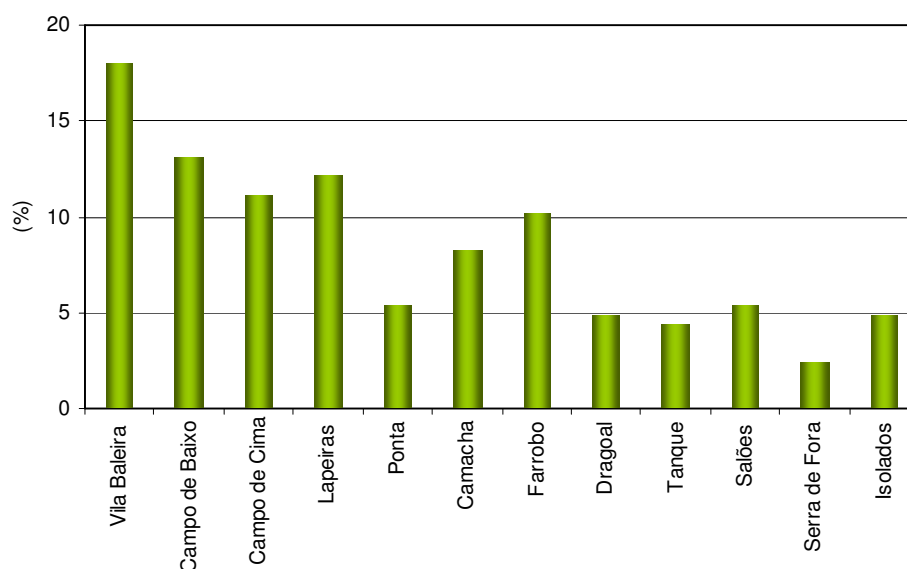


Figura III.5 – Distribuição dos inquiridos (%) por lugar onde reside.

Verificou-se no âmbito desta análise que é o sexo feminino que tem maior representatividade, o que é comprovado pelo facto de 57% dos inquiridos serem mulheres. Relativamente ao estado civil dos inquiridos 48% são casados, 47% solteiros e os restantes 5% estão distribuídos por viúvos, divorciados e união de facto.

No que respeita à idade dos inquiridos, tendo em atenção que a selecção da amostra se baseou em critérios da dimensão populacional (INE 2001), com o objectivo de ser representativa da população residente, verifica-se que as faixas etárias com mais peso na resposta aos inquéritos foram as de “20-29” e “30-39”, o que vem demonstrar uma população bastante jovem e pouco envelhecida (Figura III.6).

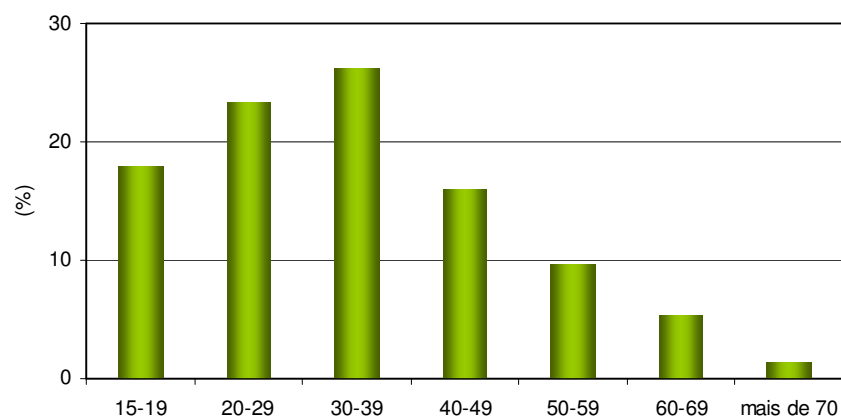


Figura III.6 – Distribuição dos residentes inquiridos (%) por faixa etária.

Relativamente ao nível de escolaridade, 46% possui ensino secundário e cerca de 14% estão no 3º CEB. Existe ainda uma percentagem considerável de residentes com habilitações superiores (17%). Estes dados confirmam a grande representatividade de residentes em idade jovem. O índice de analfabetismo e de residentes que sabem ler e escrever sem frequentar a escola é muito baixo (Figura III.7).

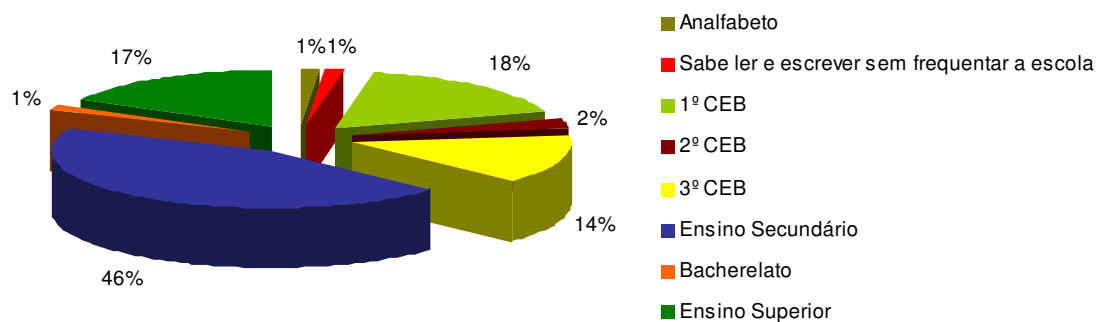


Figura III.7 – Distribuição dos residentes inquiridos (%) por nível de escolaridade.

No que respeita à condição perante o trabalho, mais de metade da população inquirida exerce uma actividade económica (58%), 25% são estudantes, 7% domésticas e apenas 3% desempregados e reformados (Figura III.8).

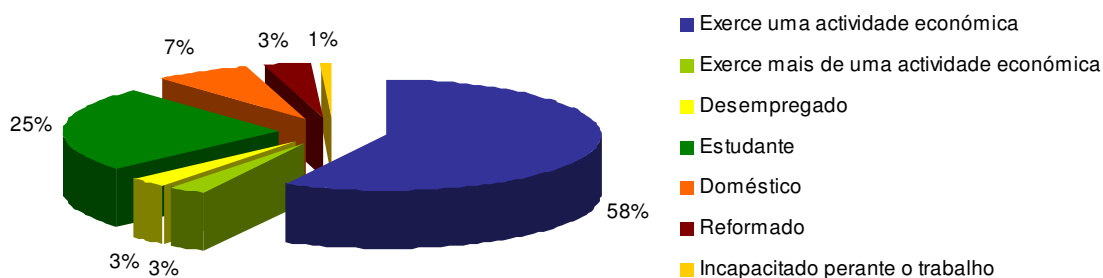


Figura III.8 – Distribuição dos residentes inquiridos (%) segundo a condição perante o trabalho.

III.3.2 Percepção dos residentes face à desertificação

Quando questionados sobre o reconhecimento do termo “*degradação do solo/desertificação*”, 74% da população inquirida conhece-no, sendo que 12% não o reconhece e 12% não sabe ou não responde.

Dos inquiridos que reconhecem o termo “*degradação do solo/desertificação*” e emitem uma opinião acerca do seu significado (Figura III.9), verificou-se que a maior tendência de respostas, com 23%, foram para “solos empobrecidos / desqualificados / inférteis”, 20% respondem que são “solos degradados que sofreram erosão”. Uma menor percentagem de inquiridos responde que são “solos desflorestados” (12%) ou “solos abandonados” (12%). Dentro das respostas que atribuem causas à degradação do solo, verificou-se que a maior percentagem vai para causas humanas (10%), enquanto apenas 5% consideram ser por causas naturais. Existe ainda uma pequena percentagem de inquiridos (5%) que atribuem a degradação dos solos à poluição ou aos longos períodos de seca. Cerca de 8% não sabem ou não respondem.

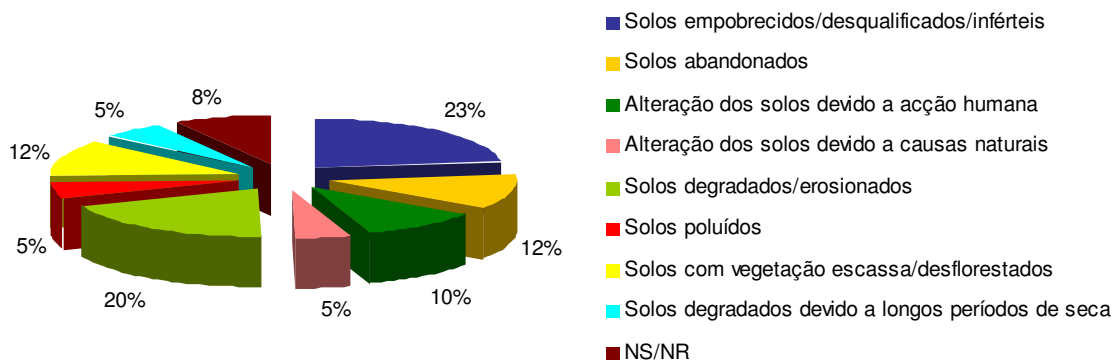


Figura III.9 – Resposta à questão “O que entende por degradação do solo/desertificação?”

Relativamente às causas que em geral são atribuídas ao processo de desertificação, a maior parte dos inquiridos (72%) consideram causas naturais e humanas, embora relativamente aos inquiridos que consideram ser só devido a uma delas a maior percentagem recai novamente sobre causas humanas (20%), enquanto apenas 4% atribuem a causas naturais.

No sentido de clarificar quais as principais causas responsáveis pelo processo de degradação do solo/desertificação, foi pedido aos inquiridos para especificarem estas causas (Figura III.10). Assim, verificou-se que a “seca” (também referido como falta de chuva ou aridez) e as “más práticas humanas” são reconhecidas por cerca de 11 a 12% dos inquiridos. Entre 7 a 9% atribuem as causas às “catástrofes naturais / alterações climáticas”, ao “abandono da agricultura”, à “construção sem planeamento”, e ainda à “poluição”. Uma percentagem menor de inquiridos (4 a 5%) refere, ainda, como causas a “desflorestação”, a “erosão”, e os “solos inférteis”. Contudo, existe uma grande percentagem de inquiridos (29%) que assinala não sabe ou não responde.

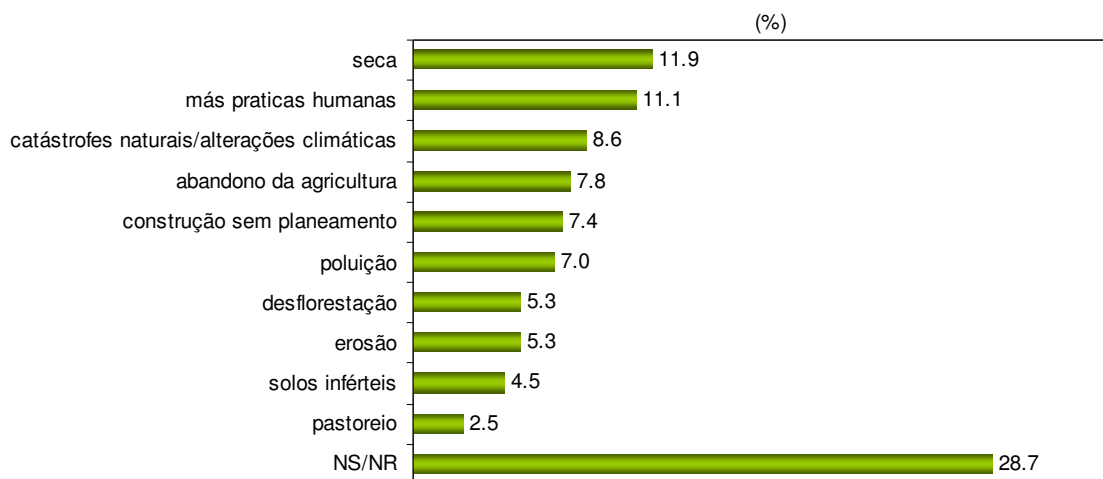


Figura III.10 – Resposta à questão “Quais as causas que atribui ao processo de degradação do solo/desertificação? Especifique.”.

Relativamente às principais consequências do processo de desertificação, foram assinaladas: o “empobrecimento do solo” (25%), a “alteração das condições hidrológicas de superfície devido à perda de coberto vegetal” (20%) e ainda a “degradação das populações animais e vegetais” (20%). Foram também assinaladas, com menor percentagem, o “abandono da actividade agrícola” (17%) e a “alteração das condições geo-hidrológicas” (12%). Existem ainda alguns dos inquiridos (7%), que consideram que o “despovoamento” é consequência do processo de desertificação (Figura III.11).

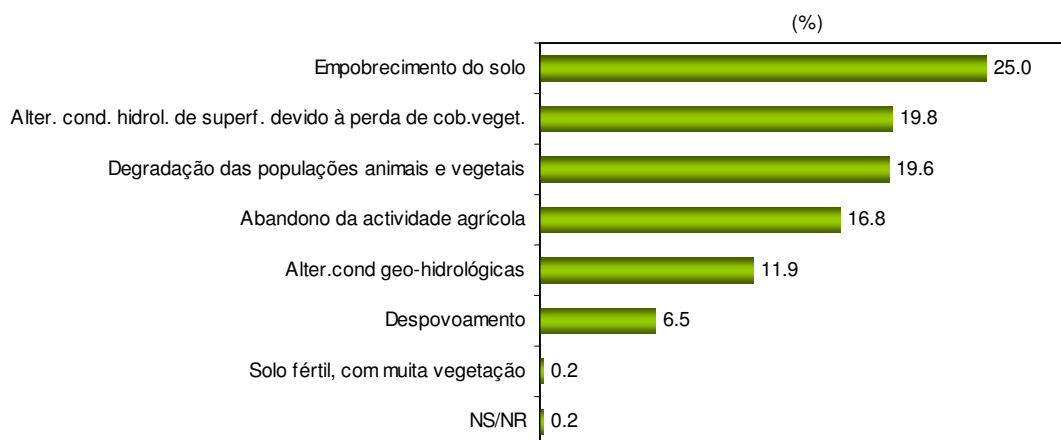


Figura III.11 – Resposta à questão “Quais as consequências do processo de desertificação?”.

Quando questionados sobre a origem do conhecimento sobre a problemática da desertificação (Figura III.12), verifica-se que este provém dos “meios de comunicação” (32%). Contudo os residentes assinalam com bastante frequência (24%) que o conhecimento provém do “contacto directo com a Ilha de Porto Santo”, e uma percentagem considerável assinala por “aprendizagem” (21%). As “conversas com familiares e amigos” também contribuem bastante (16%) para o conhecimento sobre o problema. Uma baixa percentagem assinala “vivência do problema” (4%) e o “conhecimento técnico” (3%).

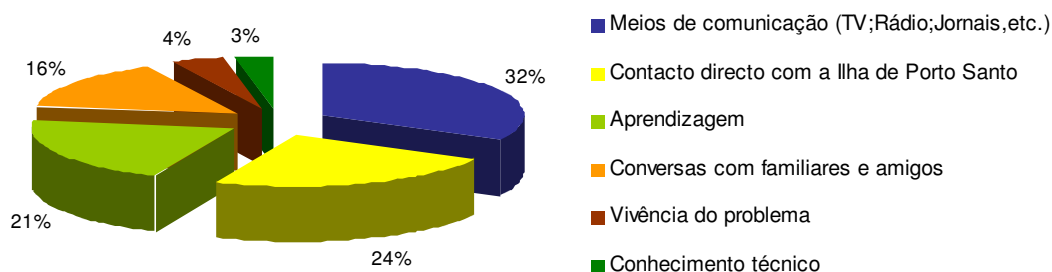


Figura III.12 – Resposta à questão “Onde adquiriu o conhecimento sobre os problemas de desertificação?”.

III.3.2.1 Percepção dos residentes face à desertificação na Ilha de Porto Santo (causas, consequências, medidas)

No que se refere à percepção dos inquiridos, face ao facto da Ilha de Porto Santo ter sofrido degradação do solo ao longo dos tempos, constatou-se que 78% consideram este facto verdadeiro contra 11% que respondem negativamente e 11% não sabem ou não respondem a esta questão.

Considerando apenas os inquiridos que concordam com o facto da Ilha ter sofrido degradação do solo ao longo dos tempos, destacam-se 68% que apontam ambas as causas (humanas e naturais) como responsáveis por esta degradação. No entanto, 21%, remetem unicamente para causas humanas, enquanto apenas 9% atribuem a desertificação a causas naturais.

Tabela III.4 – Causas atribuídas ao processo de degradação do solo / desertificação na Ilha de Porto Santo.

Causas que os residentes atribuem ao processo de degradação do solo/desertificação	N	(%)
• Seca/aridez/falta de chuva	25	11,5
• Passividade humana/más praticas	20	9,2
• Abandono da agricultura	19	8,8
• Paisagem degradada/abandono dos terrenos	14	6,5
• Catástrofes naturais/alterações climáticas	8	3,7
• Desflorestação/vegetação escassa/incêndios	8	3,7
• Construção sem planeamento	7	3,2
• Erosão	7	3,2
• Poluição	7	3,2
• Falta de mão-de-obra para a florestação	6	2,8
• Exploração de pedreiras	4	1,8
• Solos inférteis/utilização excessiva dos solos	2	0,9
• Pastoreio	2	0,9
• NS/NR	88	40,6
TOTAL	217	100

Pela análise da Tabela III.4 verifica-se que, de entre as causas especificadas para explicar a degradação do solo/desertificação na Ilha de Porto Santo, as mais referidas foram: a “seca” (também referido como falta de chuva ou aridez) (12%), seguido de “más praticas humanas” (9%) e “abandono da agricultura” (9%). Entre 4 a 6% atribuem as causas à “paisagem degradada/abandono dos terrenos”, “desflorestação”, à “erosão”, e ainda a “catástrofes naturais/alterações climáticas”. Uma percentagem menor de

inquiridos referem ainda como causas a “poluição”, a “construção sem planeamento”, a “exploração de pedreiras”, o “pastoreio” e a “falta de mão-de-obra para florestação”. Saliente-se que cerca de 41% não sabem ou não respondem a esta questão.

Pela análise da Figura III.13, verifica-se que os inquiridos consideram que o processo de desertificação tem afectado essencialmente a vegetação, tornando-a cada vez mais escassa (20%). Evidenciam também a existência de solos mais degradados (18%), bem como o abandono da actividade agrícola/pecuária/silvícola (17%). Com uma percentagem considerável foram ainda apontadas situações como o agravamento da erosão (14%) e os recursos hídricos limitados (12%). Com menor percentagem foram apontados outros aspectos, nomeadamente: a perda de biodiversidade e recursos naturais limitados. Ainda 2% é da opinião que a desertificação irá afectar a Ilha de Porto Santo no futuro.

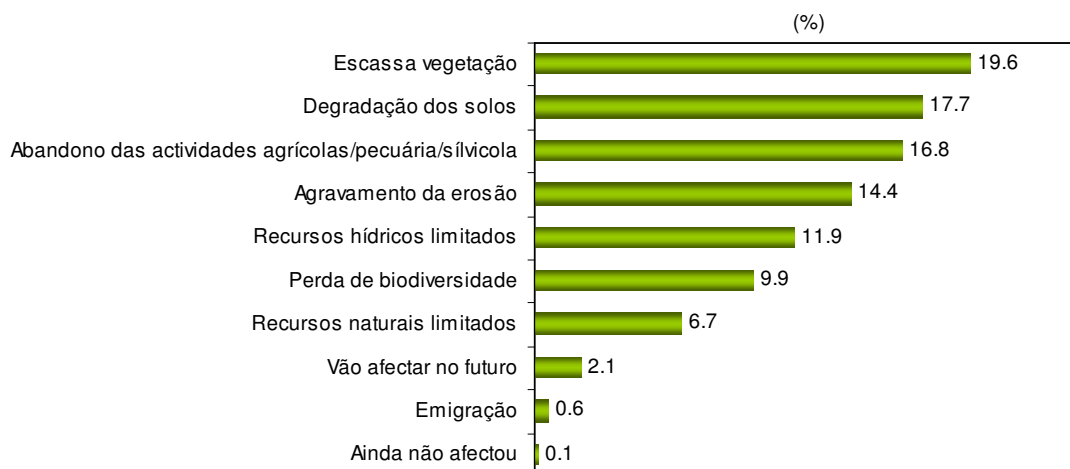


Figura III.13 – Resposta à questão “De que forma é que o processo de desertificação tem afectado a Ilha de Porto Santo?”.

Um total de 76% da população inquirida aponta as medidas mais urgentes a serem tomadas para atenuar as consequências do processo de desertificação (Figura III.14). Destes, 12% consideram como principais medidas: a “recuperação e conservação do coberto vegetal” e o “o repovoamento florestal”. Entre 7 a 10% dos residentes referem: “novos sistemas de captação e armazenamento de água”; a “protecção da paisagem” e a “sensibilização das pessoas”, a “gestão das águas escorrência” e ainda a “recuperação de práticas agrícolas tradicionais”. Uma menor percentagem de residentes (6 a 7%) considera igualmente importante haver “Incentivos às populações”, “reutilização da água”, “aplicação de políticas de ordenamento do território” e ainda “novas práticas agrícolas”.

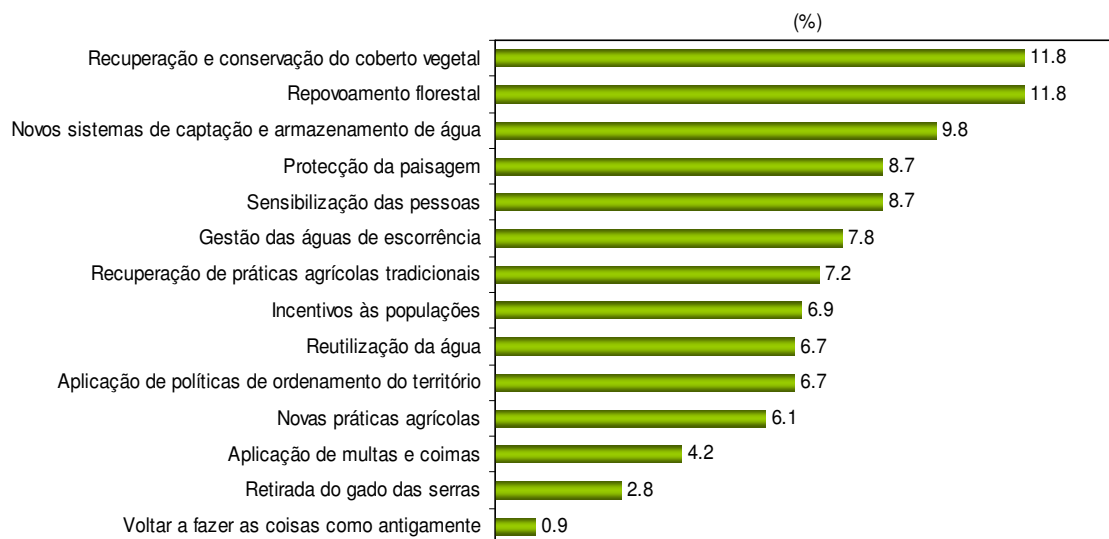


Figura III.14 – Resposta à questão “Quais as medidas necessárias para atenuar as consequências do processo de desertificação?”.

No que concerne às medidas de prevenção/combate aos problemas de desertificação, cerca 31% da população inquirida considera que já foram tomadas algumas medidas, 41% refere que ainda não foram tomadas quaisquer medidas, no entanto, 20% não sabe ou não responde a esta questão.

As entidades responsáveis pela tomada de medidas de combate à desertificação são identificadas por apenas 32% da população inquirida. Destes, 62% consideram que a Direcção Regional de Florestas/Posto Florestal de Porto Santo é a principal responsável, enquanto 24% consideram a Câmara Municipal de Porto Santo/Porto Santo Verde. Ainda 14% não sabem ou não respondem a esta questão.

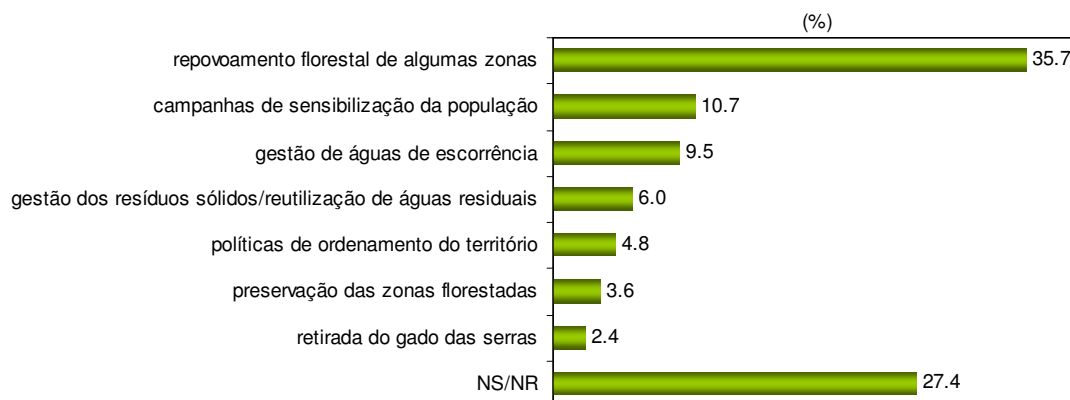


Figura III.15 – Medidas que têm sido tomadas pelas entidades competentes para combater o processo de desertificação.

As medidas mais referidas pelos residentes são (Figura III.15): o “repovoamento florestal de algumas zonas” (36%), “campanhas de sensibilização da população” (11%), a “gestão de águas de escorrência” através da construção de barragens e represas (9%) e, ainda, a “gestão dos resíduos sólidos e/ou a reutilização de águas residuais” (6%). Com menos representatividade surgem as “políticas de ordenamento do território”, “preservação de zonas florestadas” e a “retirada de gado das serras”. Contudo, existe uma grande percentagem de inquiridos que assinalam não sabe ou não responde (27%).

Os inquiridos dispõem-se a desenvolver acções para minimizar o problema da desertificação na Ilha (Tabela III.5), do qual se destacam as acções relacionadas com a disponibilização para participar em acções de sensibilização à população (21%). A preservação da natureza e do coberto vegetal existente, a poupança de água e plantação de mais árvores na Ilha, são também algumas das acções mais apontadas pelos inquiridos. Algumas pessoas, contudo, consideram que a desertificação só poderá ser minimizada através da actuação das entidades competentes. Saliente-se que 28% não sabem ou não respondem a esta questão.

Tabela III.5 – Acções apresentadas pelos residentes para minimização do problema de desertificação na Ilha.

Acções referidas pelos inquiridos quando questionados sobre o que estaria disposto a fazer para minimizar o problema de desertificação na Ilha.	N	(%)
• Apresentar disponibilidade para participar em acções de sensibilização à população	42	21,3
• Ajudar a preservar a vegetação existente	16	8,1
• Preservar o jardim em casa e plantar mais árvores (e.g. árvores de fruto)	16	8,1
• Sensibilizar e contribuir para a preservação da natureza e/ou poupança de água	16	8,1
• Plantar mais árvores nativas e adaptadas ao clima da Ilha	12	6,1
• Incentivar as boas práticas	11	5,6
• É difícil actuar individualmente, este é um problema global que deverá ser resolvido pelas entidades competentes	9	4,6
• Agir correctamente na separação dos resíduos evitando a deposição a céu aberto	8	4,1
• Contribuir no aproveitamento de águas pluviais (e.g. construção de cisternas nas habitações)	4	2,0
• Alertar as entidades responsáveis para preservação/recuperação de áreas danificadas	3	1,5
• Seguir as recomendações das entidades responsáveis	2	1,0
• Organização de uma equipa de estudo para avaliar o estado dos solos da Ilha	1	0,5
• Criação de um viveiro para introdução de novas espécies de árvores na Ilha	1	0,5
• Denunciar os prevaricadores	1	0,5
• NS/NR	55	27,9
TOTAL	197	100,0

Considerando o facto da acção humana ser responsável pela alteração de algumas condições ambientais, tentou-se clarificar qual a opinião dos inquiridos relativamente a este aspecto (Figura III.16). Deste modo, os residentes consideram que a componente ambiental mais afectada pela acção humana é o sistema dunar (22%), seguindo-se a vegetação (20%), a paisagem (17%), o solo (14%) e ainda os recursos hídricos (12%). Apenas 7% consideram a fauna e 6% não sabem ou não respondem a esta questão. Apenas 2% consideram a fauna e 6% não sabem ou não respondem a esta questão.

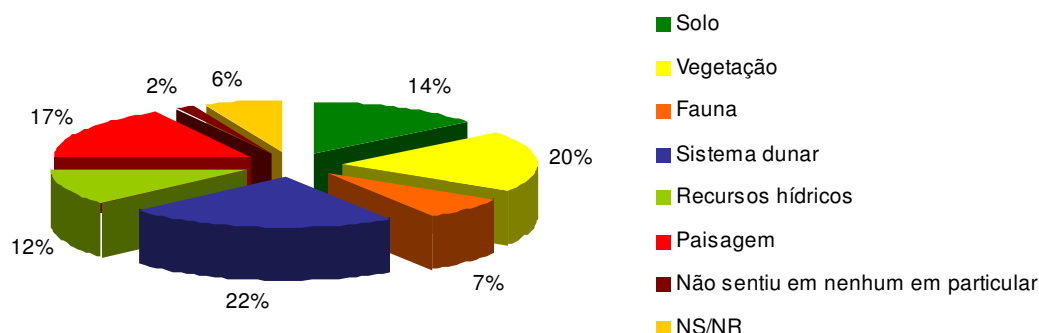


Figura III.16 – Componentes ambientais mais afectados pela acção humana.

Pretendeu-se ainda esclarecer de que modo é que os residentes consideram o papel da acção humana sobre cada um dos componentes ambientais.

Tabela III.6 – Razões apontadas pelos residentes sobre o modo como a acção humana tem afectado o solo.

<i>De que modo é que a acção humana tem afectado o solo?</i>	N	(%)
• Abandono da agricultura	16	9,5
• Exploração de pedreiras/extracção de areia	11	6,5
• Poluição/deposição de resíduos a céu aberto	10	5,9
• Construção em demasia	9	5,3
• Solos inférteis (e.g. cultura abusiva no passado levou ao empobrecimento do solo)	7	4,1
• Falta de vegetação acentua continuamente a degradação do solo	2	1,2
• NS/NR	29	17,2
• Não assinalou	85	50,3
TOTAL	169	100,0

As principais razões apresentadas sobre o solo são: o “abandono da agricultura”, a “exploração de pedreiras/extracção de areia” e a “poluição”. Contudo, cerca de 50% dos inquiridos não assinalam esta componente ambiental e 17% não sabem ou não respondem (Tabela III.6).

Tabela III.7 – Razões apontadas pelos residentes sobre o modo como a acção humana tem afectado a vegetação.

<i>De que modo é que a acção humana tem afectado a vegetação?</i>	N	(%)
• Florestação insuficiente (e.g. falta a plantação de mais árvores nativas e combate à monocultura)	21	13,0
• Impermeabilização dos solos (e.g. habitações, campo de golfe, grandes empreendimentos hoteleiros, aeroporto)	13	8,0
• Falta de preservação do coberto vegetal	12	7,4
• Falta de rega durante o repovoamento florestal	6	3,7
• Solos degradados não permitem o desenvolvimento da vegetação	5	3,1
• Espécies ameaçadas (e.g. colheita abusiva do endemismo selvageira)	3	1,9
• Abandono da agricultura	3	1,9
• NS/NR	41	25,3
• Não assinalou	58	35,8
TOTAL	162	100,0

No que se refere aos efeitos da acção humana sobre a vegetação, 13% dos inquiridos afirmam que a florestação é insuficiente, tanto devido à falta de plantação de espécies nativas como para o combate à monocultura existente. Outros referem que a vegetação tem sido afectada essencialmente devido à impermeabilização dos solos (e.g. habitações, campo de golfe, grandes empreendimentos hoteleiros, aeroporto). Ou ainda, consideram que existe falta de preservação do coberto vegetal e também falta de rega. Saliente-se que, cerca de 36% dos inquiridos não assinalam esta questão, e 25% não sabem ou não respondem (Tabela III.7).

Tabela III.8 – Razões apontadas pelos residentes sobre o modo como a acção humana tem afectado o sistema dunar.

<i>De que modo é que a acção humana tem afectado o sistema dunar?</i>	N	(%)
• Pressão da construção junto ao cordão dunar ou sobre a duna (e.g. empreendimentos hoteleiros, bares, promenade)	50	28,7
• Destruição/desnudamento do cordão dunar (e.g. pisoteio, motociclos)	28	8,0
• Retirada de areia para utilização na construção civil	7	4,0
• Má construção dos acessos / acessos clandestinos à praia	3	1,7
• Falta de protecção (e.g. poluição)	3	1,7
• NS/NR	39	22,4
• Não assinalou	44	25,3
TOTAL	174	100,0

O sistema dunar foi a componente ambiental considerada, pelos residentes, como a mais afectada pela acção humana, e as razões mais referidas foram: a “pressão da construção junto ao cordão dunar ou sobre a duna (e.g. empreendimentos hoteleiros, bares, promenade)” (29%), a “destruição ou desnudamento do cordão dunar (e.g. pisoteio, motociclos)” (8%) e a “retirada de areia para utilização na construção civil” (4%). No entanto, cerca de 25% dos inquiridos não assinalam esta questão e 22% assinalam não sabe ou não responde (Tabela III.8).

No que concerne ao modo como a acção humana tem afectado os recursos hídricos apenas 31% dos inquiridos indicam razões, como: a “má gestão na captação de águas/mau aproveitamento dos recursos hídricos” (9%), a “contaminação das águas subterrâneas” (5%), o “consumo excessivo de água mesmo quando esta é escassa” (5%), a “destruição/extinção das nascentes de água (e.g. furos para detecção de água)” (5%). E, com menor expressão (entre 2 a 3%), referem a “má conservação das barragens”, a “construção no leito das ribeiras” e ainda a “poluição das águas armazenadas nas represas”. Saliente-se que, cerca de 57% dos inquiridos, não assinalam esta componente ambiental e 12% assinalam não sabe ou não responde.

A paisagem é também uma componente ambiental que, segundo os residentes (41% dos inquiridos), é afectada pela acção humana, sendo que, os efeitos que mais a influenciam relacionam-se com: a “construção sem planeamento” (12%), as “más práticas (e.g. exploração de pedreiras, deposição de resíduos a céu aberto)” (10%), a “má preservação e não restauração de imóveis antigos (e.g. casas típicas, fontanários, moinhos de vento)” (9%). Com menor representatividade, entre 3 a 4%, consideram ainda a “má preservação de pontos turísticos (e.g. jardins públicos, Fonte de Areia)” a “existência de solos nus e erosionados (e.g. Picos do Concelho, Maçarico)” e a “má conservação das paredes de pedra/muros de protecção/socalcos”. Refira-se que, 43% dos inquiridos não assinalam esta questão e 16% assinalam não sabe ou não responde.

Relativamente ao modo como a acção humana tem afectado a fauna, apenas um reduzido universo de inquiridos emitiu opinião sobre este assunto (cerca de 7%), e apontam aspectos como: as “espécies ameaçadas devido à poluição”, a “caça de espécies protegidas, como por exemplo a cagarra”, a “impermeabilização do solo” e ainda a “pesca ilegal (com recorrência a redes ou bombas)”. Cerca de 75% dos inquiridos não assinalam esta questão, e 17% assinalam não sabe ou não responde.

Os residentes foram ainda questionados acerca da sua opinião relativamente, à relação de alguns factores com o processo de degradação do solo/desertificação.

Perante a questão *“Relaciona o uso inadequado do solo com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?”*, cerca de 37% dos inquiridos respondem afirmativamente, 35% não relacionam estes dois aspectos e, ainda, 28% não sabem ou não respondem a esta questão. Dos que relacionam o uso inadequado do solo com o processo de degradação do solo/desertificação, 13% atribuem essa relação ao “abandono da agricultura” e 12% à “erosão acentuada”. Outras razões apontadas (entre 3 a 8%) têm a ver com a “deposição de resíduos a céu aberto”, a “monocultura” e ainda “a falta de atenção das entidades responsáveis”, contudo 58% não sabem ou não respondem, apesar de terem respondido afirmativamente.

No que respeita à questão *“Relaciona o uso excessivo de recursos naturais com o processo de degradação do solo / desertificação na Ilha?”*, 48% não encontram nenhuma relação e apenas 19% consideram existir alguma relação, e cerca de 33% não sabem ou não respondem. Dos inquiridos que respondem afirmativamente, apresentam as seguintes razões para explicar a relação entre o uso excessivo de recursos naturais com o processo de degradação do solo/desertificação: a) o facto de existir falta de planeamento no que se refere à extracção de inertes (e.g. extracção de pedra e areia) (37%); b) o corte de árvores ao longo dos tempos (e.g. para utilização na construção de habitações ou para abrir espaço para passagem de estradas) (15%) e c) o consumo excessivo de água mesmo quando esta é escassa (9%). Cerca de 39% assinalam não sabe ou não responde.

Quando se questionou os residentes sobre se *“Relaciona as secas prolongadas com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?”*, 70% dos inquiridos respondem afirmativamente, 21% não sabem ou não respondem e apenas 9% não encontram relação entre estes dois fenómenos. As razões apresentadas pelos inquiridos para explicar esta relação, estão expostas na Tabela III.9. Sendo que, as razões com maior representatividade são: a “baixa pluviosidade/falta de água para rega” (27%) e a “vegetação escassa”. Foram ainda apontadas outras razões como o “agravamento da erosão”, as “condições climáticas da Ilha” e o facto de não haver renovação das águas subterrâneas. Saliente-se que cerca de 54% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

Tabela III.9 – Razões apresentadas para justificar a relação das secas prolongadas com o processo de degradação do solo/desertificação.

<i>Relaciona as secas prolongadas com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha? Porquê?</i>	N	(%)
• Baixa pluviosidade/falta de água para rega	41	27,0
• Vegetação escassa	10	6,6
• Agravamento da erosão	5	3,3
• Condições climáticas da Ilha (clima árido)	5	3,3
• Má gestão na captação de águas pluviais	4	2,6
• Não há renovação das águas subterrâneas	2	1,3
• Interrompe-se o ciclo natural das espécies vegetais (não permite a produção de sementes)	1	0,7
• NS/NR	82	53,9
TOTAL	152	100,0

Face à questão “*Relaciona a monocultura cerealífera com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?*”, metade dos inquiridos (50%) não encontram relação entre os dois aspectos, 33% não sabem ou não respondem à questão e apenas 17% são da opinião que existe relação. Destes últimos, 29% justificam que a monocultura cerealífera se relaciona com o processo de degradação do solo / desertificação devido ao “abandono da agricultura”, e explicam que no passado quando se praticava a cultura cerealífera os solos se mantinham preservados, e hoje em dia devido ao abandono os solos degradaram-se. Uma outra razão apontada para justificar a degradação dos solos pela monocultura cerealífera foi o facto desta “contribuir para o empobrecimento/exaustão do solo”. Saliente-se que 53% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

Perante a questão “*Relaciona o pastoreio com o processo de degradação do solo / desertificação na Ilha?*”, 41% respondem negativamente, 32% não sabem ou não respondem e 27% dos inquiridos consideram que estes dois aspectos estão relacionados. As razões apontadas para justificar a relação existente, são as seguintes: a) os animais devastam a vegetação (29%); b) o pastoreio deveria continuar apenas em áreas delimitadas para evitar a degradação do solo (10%); c) o gado destruiu as paredes de pedra que travavam a erosão (7%). Refira-se que 55% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

Relativamente à questão “*Relaciona o abandono das actividades agrícola/pecuária/sílvicola com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?*”, 60% dos inquiridos respondem afirmativamente, 23% não sabem ou não

respondem e 17% não encontram nenhuma relação. As razões apresentadas para justificar esta relação, estão expostas na Tabela III.10.

Tabela III.10 – Razões apresentadas para justificar a relação do abandono das actividades agrícola/pecuária/silvícola com o processo de degradação do solo/desertificação.

Relaciona o abandono das actividades agrícola/pecuária/silvícola com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha? Porquê?	N	(%)
• A actividade agrícola evita a degradação do solo (o abandono da agricultura torna o solo mais exposto aos factores erosivos)	16	12,4
• Ocorre o abandono devido à falta de água para rega	13	10,1
• Não existe mão-de-obra para recuperação da actividade agrícola	13	10,1
• Acentuou o empobrecimento / esgotamento do solo	4	3,1
• O abandono da agricultura e a destruição dos socacos levou ao desleixo e a falta de preservação	3	2,3
• NS/NR	80	62,0
TOTAL	129	100,0

No que se refere à questão “*Relaciona a impermeabilização dos solos com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?*”, 42% dos inquiridos respondem afirmativamente, enquanto 30% não encontram nenhuma relação e 28% não sabem ou não respondem. Dos que consideraram existir uma relação entre a impermeabilização dos solos com o processo de degradação do solo/desertificação, justificam apresentando as seguintes razões: a) 11% dizem ser devido à construção de grandes empreendimentos, nomeadamente o aeroporto, o campo de golfe, hotéis e estradas; b) 9% justificam com o facto de ter havido um aumento na construção de habitação própria; c) 8% consideram que está relacionado com a substituição de zonas com comunidades vegetais e/ou solos com capacidade agrícola, por zonas urbanas e/ou turísticas e finalmente d) 5% justificam que a impermeabilização dos solos é responsável pela alteração dos ecossistemas. No entanto, 67% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

Face à questão “*Relaciona a poluição com o processo de degradação do solo / desertificação na Ilha?*”, cerca de 38% concordam que estes dois aspectos se relacionam, 37% respondem negativamente e 25% não sabem ou não respondem. As razões apresentadas pelos inquiridos para explicar esta relação, estão expostas na Tabela III.11.

Tabela III.11 – Razões apresentadas para justificar a relação da poluição com o processo de degradação do solo/desertificação.

Relaciona a poluição com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?	N	(%)
Porquê?		
• Deposição de resíduos a céu aberto (e.g. óleos usados, pilhas, entulhos)	20	25,6
• Contaminação de águas subterrâneas (e.g. esgotos, aterro sanitário)	8	10,3
• A poluição aumentou ao longo dos tempos (e.g. aumento de veículos)	3	3,8
• A utilização das águas residuais para rega, contribuem para poluição dos solos	2	2,6
• NS/NR	45	57,7
TOTAL	78	100,0

Relativamente à questão “*Relaciona o turismo/recreio com o processo de degradação do solo/desertificação na Ilha?*”, 54% não encontram nenhuma relação e apenas 16% consideram existir alguma relação, e cerca de 30% não sabem ou não respondem. As razões indicadas pelos inquiridos que respondem afirmativamente (com valores entre 3 a 9%) foram: o aumento na produção de resíduos sólidos, o facto do aumento da actividade turística contribuir para a destruição do cordão dunar, o aumento da construção de grandes empreendimentos e consequentemente a diminuição de espaços verdes e, por último, o abandono de lixo durante os passeios turísticos. Saliente-se que cerca de 70% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

III.3.3 Percepção dos residentes face à valorização do coberto vegetal para o combate ao processo de desertificação

No sentido de compreender as visões da população no que diz respeito à valorização do coberto vegetal na Ilha de Porto Santo, questionou-se sobre a importância desta ser uma boa medida no combate ao processo de desertificação, e verificou-se que na sua maioria os inquiridos respondem afirmativamente (78%), enquanto 22% não sabem ou não respondem à questão. As razões apresentadas pelos residentes para justificar a importância do coberto vegetal como medida importante no combate à desertificação estão expostas na Tabela III.12.

Tabela III.12 – Razões apresentadas para justificar importância do coberto vegetal como medida importante no combate à desertificação.

Considera que a valorização do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo possa ser uma medida importante no combate à desertificação? Porquê?	N	(%)
• Protege os solos da erosão / boa conservação e estabilização do solo	55	28,8
• O coberto vegetal contribui para o aumento da pluviosidade/retenção de água nos solos/manutenção de aquíferos	20	10,5
• Valorização do património natural (e.g. preservação da vegetação existente, repovoamento florestal com espécies nativas)	19	9,9
• É uma medida muito importante/adequada e uma mais valia para o ambiente da Ilha	13	6,8
• Importante para o enriquecimento do solo e preservação dos ecossistemas	12	6,3
• Criação de mais espaços verdes para melhorar a paisagem actual, mais qualidade de vida e saúde, turismo de natureza	12	6,3
• Considera importante, mas só viável se houver rega durante o repovoamento florestal	4	2,1
• NS/NR	56	29,3
Total	191	100,0

Verifica-se assim, que as principais razões apresentadas se referem ao facto desta medida permitir: a “protecção dos solos da erosão/boa conservação e estabilização do solo”, o “aumento da pluviosidade contribuindo para a retenção da água nos solos e manutenção dos aquíferos” e a “valorização do património natural” (uma vez que esta medida deverá ter em atenção a preservação da vegetação já existente bem como o repovoamento florestal com espécies nativas). Uma outra justificação apontada pelos residentes foi, ainda, o facto desta ser uma “medida adequada para o combate à desertificação e uma mais valia para o ambiente da Ilha”. Outros aspectos, como ser uma medida “importante para o enriquecimento do solo e a preservação dos ecossistemas” ou a “criação de mais espaços verdes para melhorar a paisagem actual, mais qualidade de vida e saúde, turismo de natureza”, foram também apontados. No entanto, cerca de 29% dos inquiridos não sabem ou não respondem.

Relativamente à percepção dos residentes quanto ao conhecimento das espécies vegetais nativas da Ilha de Porto Santo, 65% afirmam conhecer e 27% assumem que não conhecem quais são estas espécies. Cerca de 8% não sabem ou não respondem. Considerando apenas os inquiridos que respondem afirmativamente, é importante salientar que as espécies nativas mais assinaladas foram o dragoeiro (22%), o zimbreiro (12%), a oliveira brava (11%) e a urze (7%). Igualmente indicadas com grande frequência foram a tamargueira (12%), a tabaibeira (12%), a palmeira (9%), o pinheiro do alepo (5%) e o cedro de monterey (4%) (Figura III.17). Contudo, estas últimas espécies foram indicadas, sendo conhecidas pelos inquiridos como nativas, o que está incorrecto, uma

vez que se referem a espécies exóticas que foram introduzidas na Ilha em diferentes períodos históricos.



Figura III.17 – Resposta à questão “Quais as espécies nativas que faziam parte do Coberto vegetal da Ilha de Porto Santo aquando da sua descoberta?”.

Relativamente à evolução do coberto vegetal na Ilha ao longo dos tempos (Figura III.18), existe uma grande percentagem de residentes que consideram que este se tornou cada vez mais escasso (37%) e menos diversificado (com poucas espécies) (21%). Contudo, existe também uma percentagem considerável de inquiridos (14%) que é de opinião que o coberto vegetal se foi tornando cada vez mais abundante e mais diversificado.

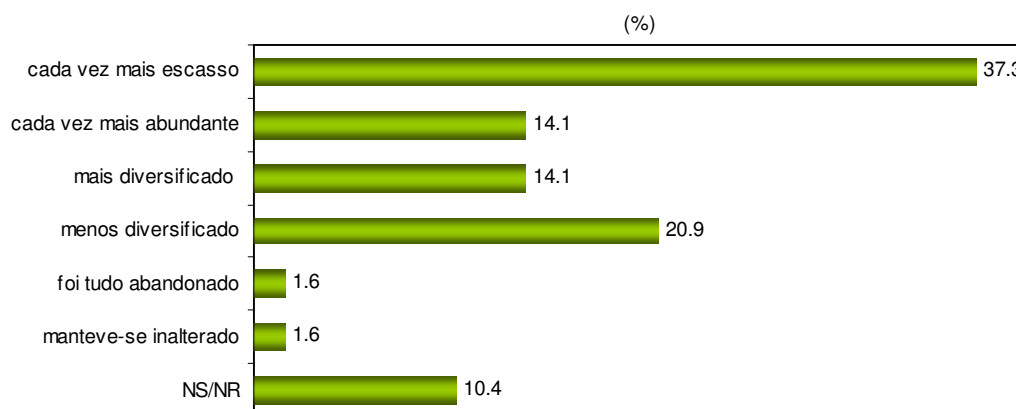


Figura III.18 – Resposta à questão “Qual a evolução do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo?”

Na opinião da população residente o coberto vegetal da Ilha é classificado actualmente, como “pouco abundante, com várias espécies” (27%), embora 23% o classifiquem como “pouco abundante, com uma ou duas espécies diferentes”, ou seja, em monocultura. Ainda, cerca de 23% consideram que o coberto vegetal é “escasso”. Uma menor percentagem (10%) classifica-o como estando “degradado”. E apenas 5 a 6% consideram o coberto vegetal como sendo abundante (Figura III.19).

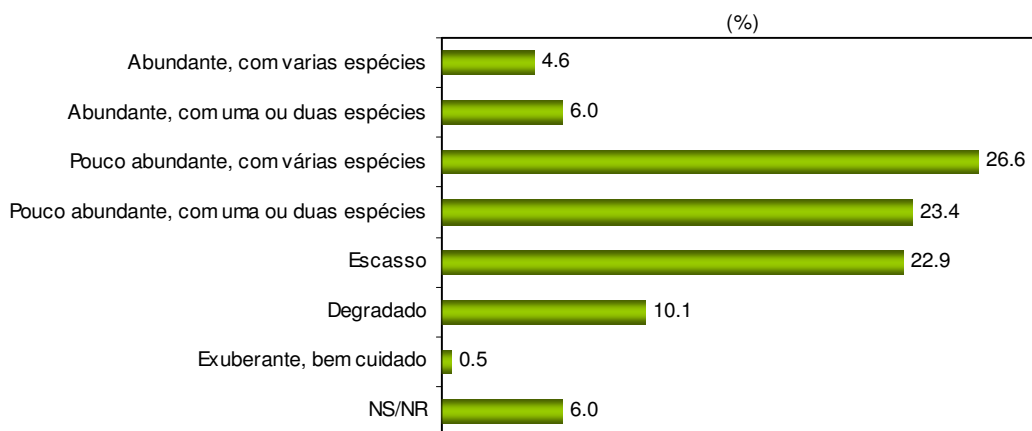


Figura III.19 – Resposta à questão “Actualmente, como classifica o coberto vegetal da Ilha de Porto Santo?”

No que concerne às zonas da Ilha que se encontram mais florestadas, os inquiridos consideram as “Zonas montanhosas” (80%), embora 13% assinalem também as “Zonas costeiras” (Figura III.20).

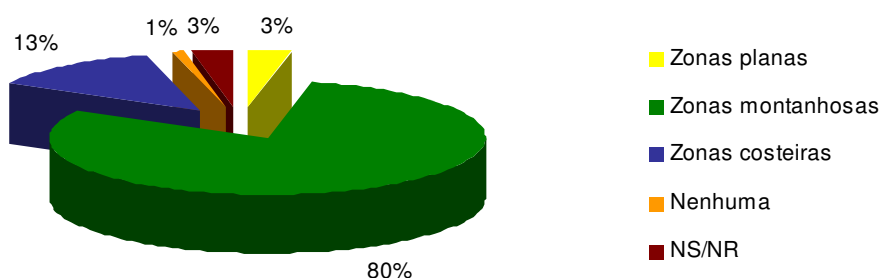


Figura III.20 – Resposta à questão “Quais as zonas mais florestadas / arborizadas, actualmente?”

Relativamente às medidas tomadas, pelas entidades competentes, para a preservação do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo, a maior parte dos residentes consideram terem sido tomadas medidas (74%), enquanto 9% consideram que não. Contudo, 17% não sabem ou não respondem a esta questão.

Quanto às medidas que consideram já terem sido tomadas, cerca de metade dos inquiridos consideram o repovoamento florestal como a principal medida, mas dividem-se

nas respostas relativamente ao tipo de espécies utilizadas nesse repovoamento, uma vez que 25% mencionam que foram utilizadas espécies nativas e 24% referem que foram utilizadas espécies exóticas. Cerca de 18% dos residentes assinalam a “limpeza das zonas de coberto vegetal”, e cerca de 15% referem a “retirada do gado ovino das serras”. Apenas 12% consideram ter sido feita a “sensibilização das pessoas” e 7% mencionam que foram dados “incentivos à população para práticas agrícolas” (Figura III.21).

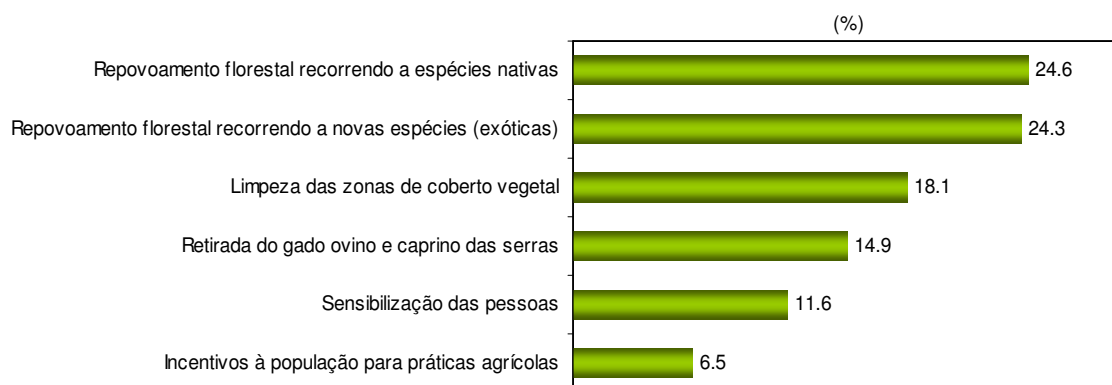


Figura III.21 – Resposta à questão “Que medidas considera terem sido tomadas, pelas entidades competentes, para preservação do coberto vegetal da Ilha?”

A opinião acerca da forma como as medidas de repovoamento florestal têm sido aplicadas, foi emitida por cerca de 63% dos inquiridos. Destes, mais de metade (52%) consideram que é “com o Pinheiro do Alepo e/ou Cedro de Monterey, em zonas degradadas”, enquanto 14% consideram que este repovoamento é feito também em zonas degradadas mas com espécies diferentes. Entre 5 a 6% assinalam que o repovoamento florestal é feito quando as árvores estão doentes ou quando estão velhas. Saliente-se que cerca de 21% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão (Figura III.22).

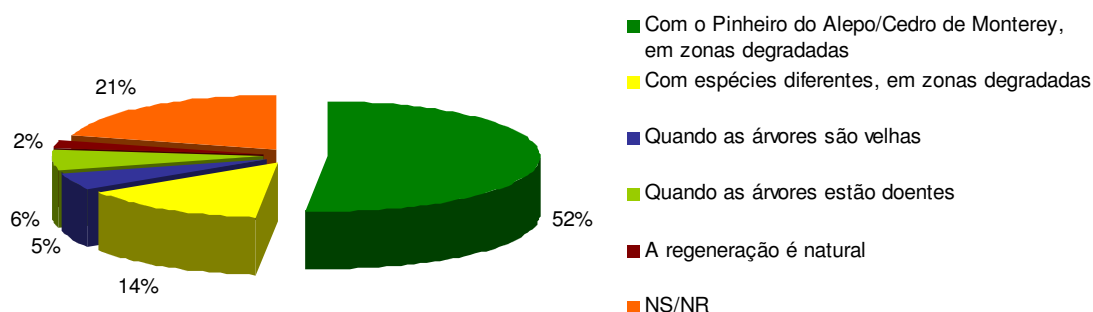


Figura III.22 – Resposta à questão “Nas medidas de repovoamento florestal, como é que estas têm sido tomadas?”.

No que concerne à opinião dos residentes quanto à existência de zonas florestadas que se restringem essencialmente a resinosas em monocultura, mais de metade dos inquiridos (55%) concordam com esta afirmação, contra 12% que discordam. No entanto, 33% dos inquiridos não sabem ou não respondem. Dos indivíduos que concordam com a existência de zonas florestadas com resinosas em monocultura, 26% referem o “Pico do Castelo” e 26% o “Sítio dos Morenos” como as zonas que evidenciam mais este problema. Algumas pessoas referem ainda os “Picos” em geral (14%) e com menor representatividade mencionam o “Pico de Ana Ferreira” e o “Pico do Facho” (Figura III.23).

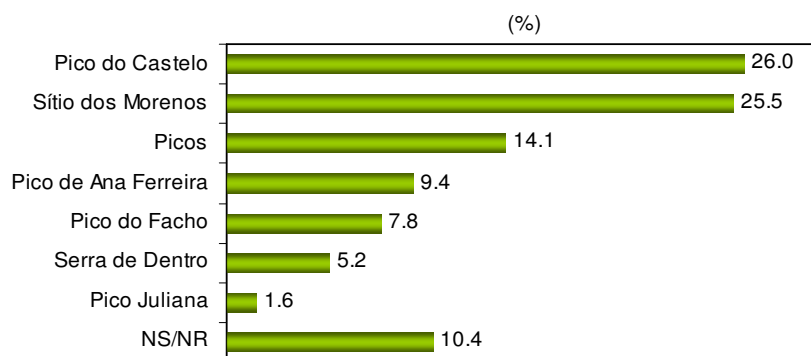


Figura III.23 – Resposta à questão “Quais as zonas florestadas com resinosas em monocultura?”.

Relativamente às consequências de uma monocultura com resinosas, mencionadas por 55% dos inquiridos, verifica-se que os aspectos mais referidos são: a “maior predisposição ao ataque de pragas e doenças” (30%), e também a “perda de biodiversidade” (26%). Uma percentagem significativa de inquiridos considera ainda o “elevado grau de combustibilidade dos materiais/risco de incêndio” (19%). Alguns residentes são da opinião que a monocultura tem apenas consequências positivas como a “boa conservação do solo e da água” (10%) (Figura III.24).

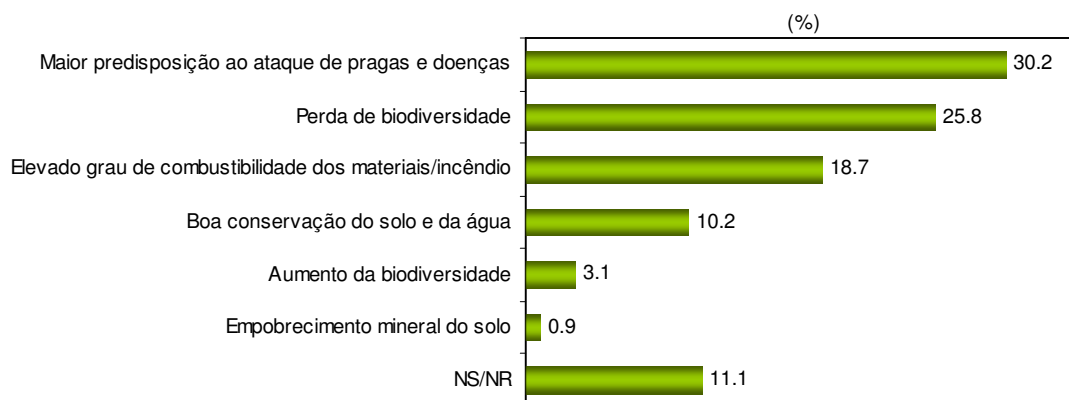


Figura III.24 – Principais consequências de uma monocultura com resinosas.

No que respeita à importância atribuída pelos residentes quanto à utilização de espécies nativas no repovoamento florestal como alternativa à monocultura, metade (50%) dos inquiridos respondem afirmativamente e apenas 1% não atribuem qualquer importância. No entanto, 29% dos inquiridos afirmam nunca terem pensado no assunto e 20% não sabem ou não respondem à questão (Figura III.25).

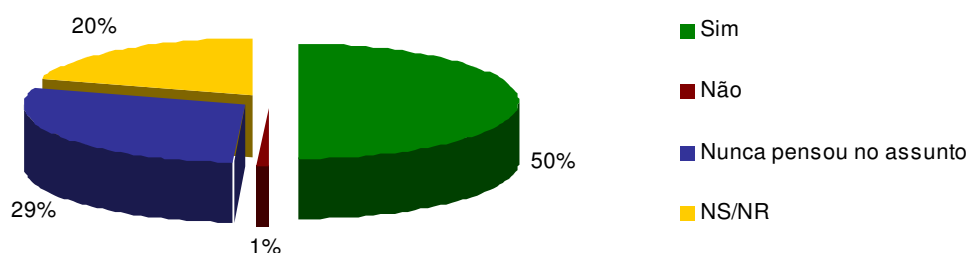


Figura III.25 – Resposta à questão “Considera importante utilizar espécies nativas no repovoamento florestal, como combate ao problema de monocultura?”

Os inquiridos que responderam afirmativamente à questão anterior, referem que as espécies nativas que devem ser usadas para o repovoamento florestal, são essencialmente o dragoeiro (12%), a oliveira (11%), o zimbro (7%) e ainda a urze (5%). Alguns dos residentes referem ainda como exemplos de espécies algumas não nativas, como sendo o pinheiro, a palmeira e o cedro. É importante destacar que cerca de metade dos residentes (51%) não sabem ou não respondem a esta questão, o que revela um desconhecimento destas espécies pelos residentes (Figura III.26). Por um lado, consideram que estas espécies devem ser usadas na reflorestação mas, por outro, desconhecem de que espécies se tratam.

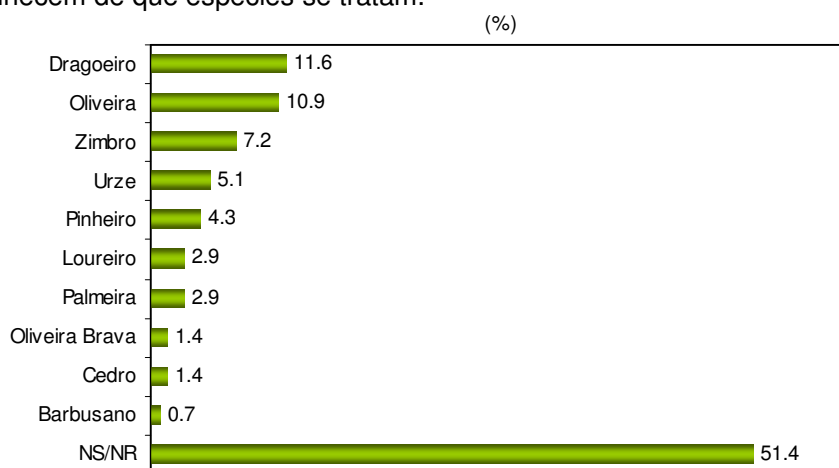


Figura III.26 – Resposta à questão “Quais as espécies nativas que considera devem ser usadas no repovoamento florestal como combate à monocultura?”

Apenas metade dos inquiridos justificam a importância da utilização de espécies nativas no repovoamento florestal (Tabela III.13). As principais razões apontadas são o facto destas “espécies serem as que melhor se adaptam às condições do solo e climáticas da Ilha” (21%) e para a “preservação das espécies nativas e divulgação das árvores originais da Ilha” (11%). Outras razões apresentadas foram ainda a “diversificação da vegetação”, “evitar as consequências negativas de uma monocultura”, a “recuperação da estabilidade do ecossistema natural e original da Ilha” e ainda a “protecção dos solos”. Para além das razões que defendem a utilização de espécies nativas na reflorestação, 3% consideram que podem ser igualmente plantadas outras espécies diferentes. Saliente-se que cerca de 45% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

Tabela III.13 – Razões apresentadas pelos residentes para justificar a importância da utilização de espécies nativas no repovoamento florestal.

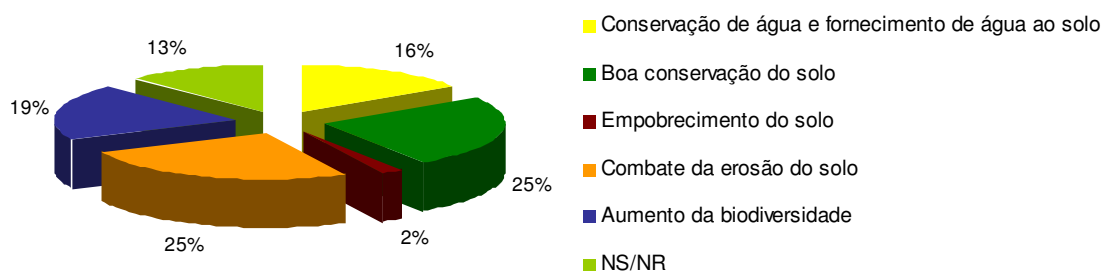
“Considera importante utilizar espécies nativas no repovoamento florestal, como combate ao problema de monocultura? Se sim, porquê?”	N	(%)
• Espécies que melhor se adaptam às condições do solo e climáticas da Ilha	21	20,6
• Preservação das espécies nativas e divulgação das árvores originais da Ilha	11	10,8
• Diversificação da vegetação	8	7,8
• Evitar as consequências negativas de uma monocultura	6	5,9
• Protecção dos solos	3	2,9
• Além das nativas, consideram que se podem plantar outras diferentes	3	2,9
• Recuperação da estabilidade do ecossistema natural e original da Ilha	2	2,0
• NS/NR	46	45,1
TOTAL	102	100,0

No caso específico da espécie nativa e endémica oliveira brava ou zambujeiro (*Olea maderensis*), 53% dos inquiridos afirmam conhecer esta espécie, 42% não conhecem e 5% não sabem ou não respondem. Relativamente aos locais da Ilha onde afirmam ter observado a oliveira brava (ver Tabela III.14), verifica-se que, na sua maioria, os locais mencionados se referem a zonas onde existe a oliveira introduzida (*Olea europaeae*) e não a oliveira brava endémica (*Olea maderensis*). Ainda 33% não sabem ou não respondem à questão.

Tabela III.14 – Locais da Ilha de Porto Santo onde foi observada a oliveira brava ou zambujeiro.

<i>Em que parte da Ilha observou a oliveira brava ou zambujeiro?</i>	N	(%)
• Pico do Castelo	30	24,8
• Vila/centro da cidade	10	8,3
• Berma da Estrada do Sítio da Camacha	7	5,8
• Sítio do Campo de Baixo	7	5,8
• Sítio dos Morenos (zona costeira)	5	4,1
• Em fotografias e livros	4	3,3
• Zona norte da Ilha	4	3,3
• Arredores do aeroporto	4	3,3
• Pico Juliana	3	2,5
• Picos em geral	3	2,5
• Sítio do Tanque	2	1,7
• Posto dos Serviços Florestais	1	0,8
• Pico Branco/Terra Chã	1	0,8
• NS/NR	40	33,1
TOTAL	121	100,0

Quanto às funções da oliveira brava, assim como outras folhosas (Figura III.27) e considerando apenas os residentes que afirmam conhecer a oliveira brava (53%), estes reconhecem como principais funções desta espécie: a “boa conservação do solo” (25%) e o “combate da erosão do solo” (25%). Consideram ainda a oliveira brava e outras folhosas fundamentais para o “aumento da biodiversidade” (19%) e para a “conservação de água e fornecimento de água ao solo” (16%).

**Figura III.27** – Principais funções da oliveira brava, assim como de outras folhosas, indicadas pelos residentes.

No que concerne à opinião dos inquiridos sobre se a oliveira brava é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da Ilha, apenas cerca de metade dos inquiridos (52%) respondem à questão e destes 39% concordam com a reintrodução da oliveira

brava na reflorestação. As razões apontadas são: a) o facto da oliveira brava ser uma “espécie que pertence à floresta original da Ilha, ou seja, nativa” (13%); b) “por ser espécie nativa, tem uma boa adaptação ao solo e ao clima da Ilha” (13%); c) “protege os solos da erosão” (11%). Com menor representatividade (2 a 8%), foram apresentadas as seguintes razões: o facto da oliveira brava ser uma “árvore que resiste bem a períodos de seca”, contribuir para o “aumento da biodiversidade”, “por razões ornamentais”, para a “preservação da espécie”, ser uma “árvore de folha persistente” e ainda o facto de “beneficiar a Ilha ao nível dos solos e da paisagem”. No entanto, cerca de 35% não sabem ou não respondem à questão (Tabela III.15).

Tabela III.15 – Razões apresentadas para justificar que a oliveira brava é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da Ilha.

<i>Na sua opinião, a oliveira brava ou zambuzeiro é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da Ilha? Se sim, porquê?</i>	N	(%)
• Espécie que pertence à floresta original da Ilha / nativa	11	12,5
• Por ser espécie nativa, tem uma boa adaptação ao solo e ao clima da Ilha	11	12,5
• Protege o solo da erosão	10	11,4
• Árvore que resiste bem a períodos de seca	7	8,0
• Aumento da biodiversidade	5	5,7
• Por razões ornamentais (é uma árvore bonita)	5	5,7
• Para preservação da espécie	3	3,4
• Árvore de folha persistente	2	2,3
• Vai beneficiar a Ilha ao nível dos solos e da paisagem	2	2,3
• Reforço da florestação	1	1,1
• NS/NR	31	35,2
TOTAL	88	100,0

Dado que os ensaios de propagação da oliveira brava por métodos tradicionais (estacaria e sementeira) se têm mostrado pouco eficazes, questionou-se a população sobre a sua concordância com a aplicação de outros métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas) para ajudar o processo de reflorestação. Perante esta questão, apenas 52% da população inquirida emitiu uma opinião, destes 63% mostram concordância, 4% não concordam, 15% afirmam nunca terem pensado no assunto e ainda 18% não sabem ou não respondem à questão. Foi ainda pedido à população inquirida que justificasse a sua concordância ou discordância com a aplicação de métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas) e as razões expostas constam da Tabela III.16. A principal razão apontada pelos residentes, tem a ver com a melhor eficácia que estes métodos mais avançados podem apresentar (31%). Outros

aspectos referidos prendem-se com o aumento/diversificação do repovoamento florestal, e com a preservação de espécies. Relativamente aos inquiridos que não concordam, as razões apresentadas revelam algum desconhecimento destes métodos de propagação.

Tabela III.16 – Razões apresentadas para justificar a concordância ou discordância com a aplicação de métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas) para ajudar o processo de reflorestação.

Porquê?	Concorda com a aplicação de métodos mais avançados (micropropagação) para ajudar a reflorestação?				Total	
	Sim		Não			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
• Se os métodos são eficazes e podem beneficiar, é importante utilizá-los na reflorestação da Ilha	23	33,3	-	-	23	31,1
• Importante contribuição para aumentar / diversificar o repovoamento florestal	13	18,8	-	-	13	17,6
• Para preservação da espécie	4	5,8	-	-	4	5,4
• Ajudar a combater a extinção de espécies ameaçadas	1	1,4	-	-	1	1,4
• Só concorda se estes métodos não alterarem as condições naturais	1	1,4	-	-	1	1,4
• Se é para beneficiar a florestação na Ilha, deveria haver investimento financeiro para desenvolver estes métodos	1	1,4	-	-	1	1,4
• As condições podem não ser as adequadas, deverá propagar-se pelos métodos tradicionais	-	-	2	40,0	2	2,7
• Poderá prejudicar outras espécies nativas	-	-	2	40,0	2	2,7
• Diminui a diversidade genética (maior predisposição ao ataque de doenças)	-	-	1	20,0	1	1,4
• NS/NR	26	37,7	-	-	26	35,1
Total	69	100	5	100	74	100

Perante a questão “*Estaria disposto a dar algum contributo para preservar as áreas onde a oliveira brava fosse reintroduzida?*”, apenas 41% da população inquirida respondeu à questão, dos quais 76% dizem estar dispostos a contribuir, 3% respondem, negativamente e 21% não sabem ou não respondem. Pediu-se aos inquiridos que explicassem de que forma estariam dispostos a dar, ou não, este contributo e as razões apresentadas estão expostas na Tabela III.17.

Os contributos apresentados pelos residentes mostram uma preocupação com o ambiente no futuro, uma vez que as principais acções apresentadas vão no sentido, de ajudar na preservação da natureza e do património natural da Ilha, da melhoria da

paisagem e do ambiente, e ainda da reintrodução de espécies nativas da Ilha para aumentar a reflorestação. Contudo, cerca de 47% não sabem ou não respondem à questão.

Tabela III.17 – Razões apresentadas para justificar de que forma os residentes estão dispostos a dar ou não algum contributo para preservar as áreas onde a oliveira brava venha a ser reintroduzida.

Porquê?	Estaria disposto a dar algum contributo para preservar as áreas onde a oliveira brava fosse reintroduzida?				Total	
	Sim		Não			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
• Ajudar na preservação da natureza e do património natural da Ilha, para um melhor ambiente no futuro	24	29,3	-	-	24	28,2
• É importante mudar e melhorar a paisagem e o ambiente da Ilha	10	12,2	-	-	10	11,8
• É importante a reintrodução de espécies nativas da Ilha e aumentar a reflorestação	9	11,0	-	-	9	10,6
• Pagar uma taxa para preservação de espaços verdes (idêntica à taxa dos resíduos)	1	1,2	-	-	1	1,2
• Considera que deve ser o estado a contribuir através dos impostos	-	-	1	33,3	9	12,2
• NS/NR	38	46,3	2	66,7	40	47,1
Total	82	100	5	100	85	100

Relativamente à avaliação da actuação da Direcção Regional de Florestas, verifica-se uma dispersão de opinião dos inquiridos, uma vez que cerca de 25% consideram a actuação positiva, 18% suficiente, 38% classificam a actuação como insuficiente e cerca de 6% negativa. Ainda 13% não sabem ou não respondem à questão (Figura III.28).

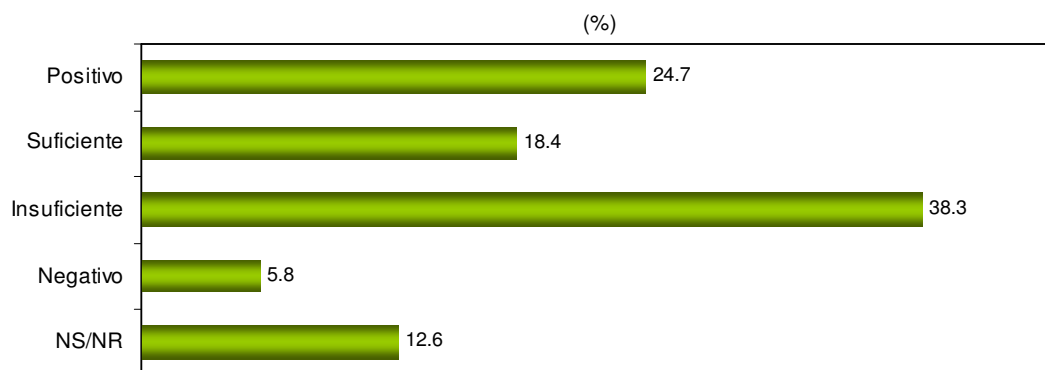


Figura III.28 – Resposta à questão “Como avalia o trabalho desenvolvido pela DRF relativamente à florestação da Ilha de Porto Santo?”.

No que se refere às razões apresentadas para justificar a actuação da DRF relativamente à florestação da Ilha (Tabela III.18), 56% da população inquirida emitiu uma opinião, no entanto 32% assinalam não sabe ou não responde.

A razão mais referida pelos inquiridos para justificar a actuação da DRF foi: “Apesar de algum esforço na reflorestação, este terá de ser maior para obtenção de melhores resultados”, contudo esta razão aparece distribuída por todos os critérios de avaliação, embora com maior representatividade pelos que avaliam como suficiente e insuficiente. Os principais aspectos apresentados pelos inquiridos que avaliam a actuação da DRF como positiva foram, o “repovoamento florestal de uma área significativa da Ilha” e “existe a preocupação da DRF na preservação das zonas florestadas”.

Relativamente aos inquiridos que consideram o trabalho insuficiente ou negativo, apontam como principais razões: “não tem havido repovoamento florestal”, “cuidados insuficientes na preservação das zonas florestadas (e.g. falta de desbaste das árvores, mato seco, limpeza)”, “necessário uma melhor gestão no armazenamento de águas pluviais para rega durante os períodos de seca”, “falta de rega durante o processo de repovoamento florestal”. Embora alguns destes aspectos tenham também sido referidos por residentes que avaliam a actuação da DRF como positivo ou suficiente. Ou seja, de um modo geral, os residentes consideram que o trabalho desenvolvido pela DRF tem sido positivo, mas contudo, faltam ainda algumas medidas a serem tomadas.

Foi ainda questionado aos residentes se no seu dia a dia, têm alguma preocupação com os assuntos apresentados no âmbito dos temas abordados no inquérito¹³, sendo que 72% dos inquiridos terão apresentado algumas preocupações. As principais preocupações apresentadas vão no sentido da preservação da natureza, a não destruição da vegetação (em zonas florestadas, sistema dunar e jardins públicos) e ainda apresentam preocupação com aspectos relativos à poluição, nomeadamente a limpeza de zonas florestadas, necessidade de maior separação dos resíduos por parte da população e ainda o facto da existência de resíduos a céu aberto nalgumas zonas da Ilha.

¹³ Tabela referente às principais preocupações dos residentes no âmbito dos temas abordados no inquérito, apresentada em anexo, Anexo VI.

Tabela III.18 – Razões apresentadas pelos residentes para justificar a avaliação da actuação da DRF relativamente à florestação da Ilha de Porto Santo.

Porquê?	Como avalia o trabalho desenvolvido pela DRF relativamente à florestação da Ilha de Porto Santo?										Total
	Positivo		Suficiente		Insuficiente		Negativo		NS/NR		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
• Apesar de algum esforço na reflorestação, este terá de ser maior para obtenção de melhores resultados	8	13,6	15	34,1	30	30,6	2	11,8	-	-	55
• Repovoamento florestal de uma área significativa da Ilha	17	28,8	2	4,5	-	-	-	-	-	-	19
• Não tem havido repovoamento florestal	-	-	-	-	8	8,2	7	41,2	-	-	15
• Cuidados insuficientes na preservação das zonas florestadas (e.g. falta de desbaste das árvores, mato seco, limpeza)	-	-	-	-	11	11,2	1	5,9	-	-	12
• Necessário uma melhor gestão no armazenamento de águas pluviais para rega durante os períodos de seca	-	-	5	11,4	6	6,1	-	-	-	-	11
• Falta de rega durante o processo de repovoamento florestal	2	3,4	3	6,8	3	3,1	2	11,8	-	-	10
• Existe a preocupação da DRF na preservação das zonas florestadas	8	13,6	-	-	-	-	-	-	-	-	8
• Falta de meios/recursos humanos/utilização de métodos tradicionais	-	-	3	6,8	3	3,1	1	5,9	-	-	7
• Recorrência a espécies exóticas no repovoamento florestal e não a espécies nativas (flora pouco diversificada)	-	-	-	-	6	6,1	1	5,9	-	-	7
• A maior preocupação das entidades está direccionada para a construção civil/desenvolvimento económico	1	1,7	-	-	5	5,1	-	-	-	-	6
• Considera haver um grande esforço humano na reflorestação, contudo, nada se pode fazer quanto às causas naturais	1	1,7	1	2,3	2	2,0	1	5,9	-	-	5
• A DRF construiu barragens para a correcção torrencial	1	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1
• NS/NR	21	35,6	15	34,1	24	24,5	2	11,8	3	100	65
Total	59	100	44	100	98	100	17	100	3	100	221

III.3.4 Caracterização dos inquiridos – Visitantes da Ilha de Porto Santo

Os IQV foram distribuídos tanto a visitantes de nacionalidade portuguesa como estrangeira (IQV na versão inglesa). Pela análise da figura III.29, verifica-se que os IQV foram realizados a cerca de 79% portugueses, 12% ingleses, 5% alemães, 1% a visitantes Venezuelanos e os restantes 3% a visitantes provenientes de outros países da Europa (Espanha, França, Roménia e Bélgica).

Dos 79% IQV realizados a visitantes de nacionalidade portuguesa, verificou-se quanto à sua residência permanente que, cerca, de 50% são provenientes de Portugal Continental e 27% são residentes na Ilha da Madeira, os restantes 23% IQV foram efectuados a residentes no estrangeiro.

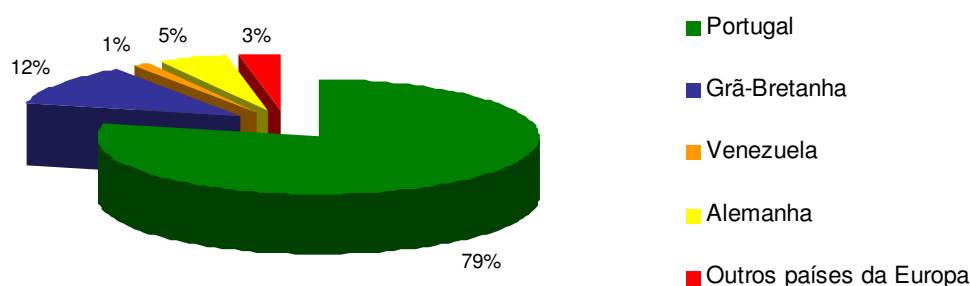


Figura III.29 – Nacionalidade da população inquirida.

No que respeita à distribuição dos inquiridos quanto ao sexo, verificou-se uma divisão equitativa entre homens e mulheres, embora com mais alguma representatividade do sexo feminino (51%). Relativamente ao estado civil, 63% são casados, 27% solteiros, 7% vive em união de facto e os restantes 3% são divorciados.

Quanto à distribuição da população inquirida por idades, verifica-se que as faixas etárias com mais peso na resposta aos IQV realizados estão entre “20-29” e “30-39”, sendo um resultado idêntico aos obtidos para os IQR. Contudo, nas faixas etárias dos “60-69” e “mais de 70”, a percentagem de inquiridos visitantes é superior aos residentes, com 13% e 6%, respectivamente (Figura III.30).

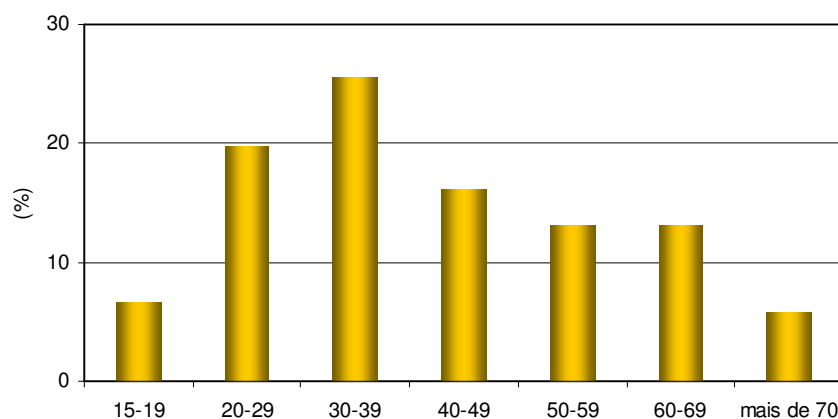


Figura III.30 – Distribuição dos visitantes inquiridos (%) por faixa etária.

No que concerne ao nível de escolaridade, a maior parte dos inquiridos tem níveis de escolaridade entre o ensino secundário e o superior, verificando-se que mais de metade da população inquirida possui habilitação superior (54%) e cerca de 28% estão no ensino secundário. Ainda 7% dos inquiridos possuem mestrado, 4% bacharelato e 2% são doutorados. Os visitantes com o 2º CEB e 3º CEB não vão além dos 2%. Desta análise não constam inquiridos do 1º CEB ou analfabetos (Figura III.31).

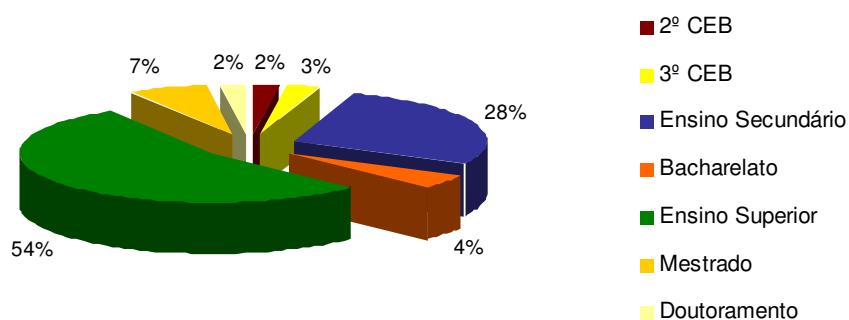


Figura III.31 – Distribuição dos visitantes inquiridos (%) por nível de escolaridade.

Na condição perante o trabalho, 70% dos visitantes exerce uma actividade económica, 14% são reformados, 12% estudantes e apenas 2% exerce mais de uma actividade económica. Quanto aos desempregados e domésticos, não vão além de 1% (Figura III.32).

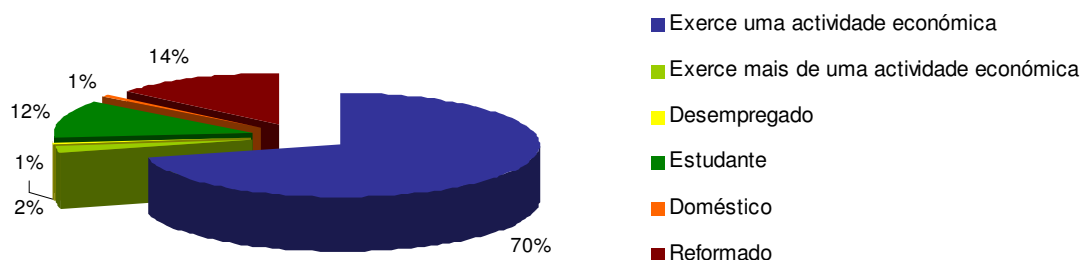


Figura III.32 – Distribuição dos visitantes inquiridos (%) segundo a condição perante o trabalho.

A maioria dos visitantes (39%) já esteve mais do que cinco vezes na Ilha. Por outro lado, cerca de 33% dos inquiridos apenas visitaram a Ilha uma vez, 12% já visitou duas vezes e, de 5 a 6% não foram além de 3 a 5 visitas à Ilha (Figura III.33).

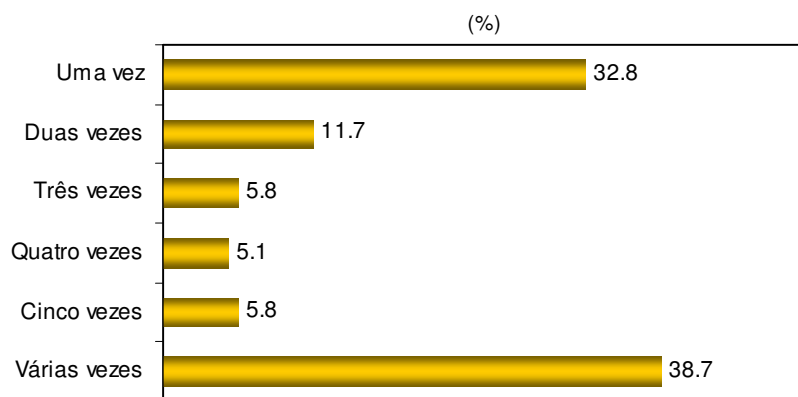


Figura III.33 – Número de vezes que os inquiridos já visitaram a Ilha de Porto Santo.

Quanto aos motivos que mais levam os turistas a visitar a Ilha, as principais preferências na escolha deste destino de férias recaem sobre a praia (25%), o clima (22%) e a paisagem (19%). Outros factores que também suscitam interesse, são a gastronomia (9%), a geologia/geomorfologia (8%), ser um local ideal para a prática de desportos (6%) e a cultura (6%). Com menor representatividade, foram ainda assinalados, o sossego/tranquilidade que a Ilha oferece (2%), a hospitalidade da população (2%), e com uma frequência inferior a 1% a vida nocturna e passeios a pé (Figura III.34).

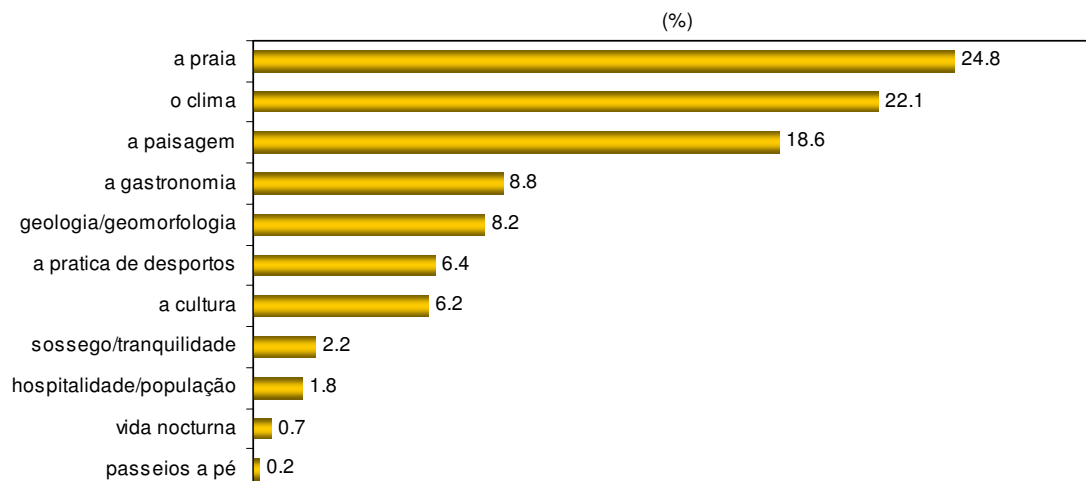


Figura III.34 – Factores que suscitam mais interesse aos inquiridos, na visita à Ilha de Porto Santo.

III.3.5 Percepção dos visitantes face à desertificação

Cerca de 86% da população inquirida reconhece o termo “*degradação do solo/desertificação*”, sendo que apenas 2% não o reconhece e 16% não sabe ou não responde.

Dos inquiridos que reconhecem o termo, verificou-se que a interpretação de “*degradação do solo/desertificação*”, é atribuída com maior representatividade: a “solos com vegetação escassa/deflorestados” (30%), “solos degradados/erosionados” (25%) e, “solos empobrecidos/desqualificados/inférteis” (17%). Ainda 7% definem como sendo “solos degradados devido a longos períodos de seca” e, 6% como “alteração dos solos devido a causas naturais”, sendo que, apenas 3% diz ser devido a causas humanas. Cerca de 7% não sabem ou não respondem a esta questão (Figura III.35).

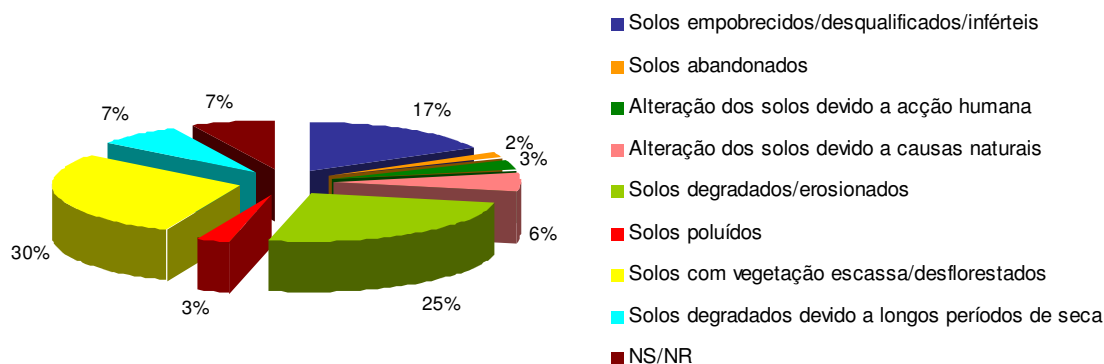


Figura III.35 – Resposta à questão “O que entende por degradação do solo/desertificação?”

Em relação às causas que são responsáveis pelo processo de desertificação, estas são atribuídas, maioritariamente, tanto a causas naturais como humanas (87% dos inquiridos). Contudo, relativamente aos inquiridos que consideram ser só devido a uma delas, a maior percentagem recai sobre as causas humanas (9%), enquanto apenas 1% atribuem a causas naturais. Ainda 3% não sabem ou não respondem a esta questão.

Foi ainda pedido aos inquiridos que especificassem estas causas (Figura III.36). Constatou-se assim, que entre 11 a 15% dos inquiridos atribuem às “catástrofes naturais/alterações climáticas”, à “desflorestação”, às “más práticas humanas” e à “construção sem planeamento”. Embora menos apontadas, foram mencionadas causas, como a “erosão” (8%), a “seca” (8%), a “poluição” (5%), os “solos inférteis” (5%), e o “abandono da agricultura/terrenos” (4%). Saliente-se que cerca de 19% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

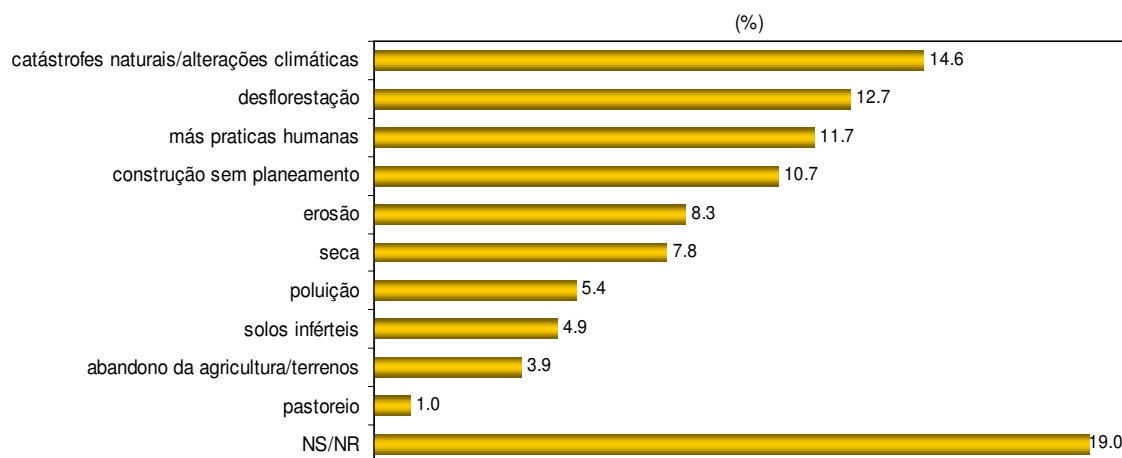


Figura III.36 – Resposta à questão “Quais as causas que atribui ao processo de degradação do solo/desertificação? Especifique.”.

Relativamente às principais consequências do processo de desertificação, verificou-se que as opiniões dos inquiridos se dividiram quase equitativamente por: “Degradação das populações animais e vegetais” (28%), “Degradação do solo/erosão” (26%), “Degradação das condições hidrológicas” (25%) e o “Despovoamento” (21%) (Figura III.37).

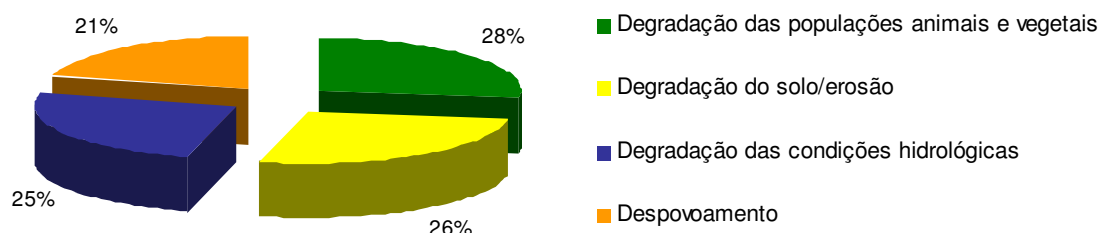


Figura III.37 – Resposta à questão “Quais as consequências do processo de desertificação?”.

O conhecimento sobre os problemas de desertificação foi obtido através dos “meios de comunicação” (39%) e de “conversas com familiares e amigos” (21%). Existe ainda uma percentagem considerável de visitantes que assinalam pelo “contacto directo com a Ilha de Porto Santo” (16%). Cerca de 12% afirmam que o conhecimento do problema provém do “conhecimento técnico”. E com menor percentagem (6 a 4%) assinalam, ainda, que o conhecimento foi adquirido por “vivência do problema” e por “aprendizagem” (Figura III.38).

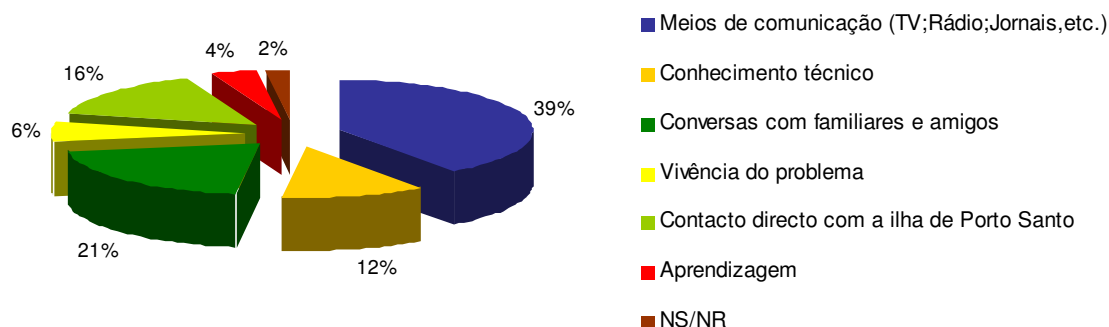


Figura III.38 – Resposta à questão “Onde adquiriu o conhecimento sobre os problemas de desertificação?”.

III.3.5.1 Percepção dos visitantes face à desertificação na Ilha de Porto Santo (causas, consequências, medidas)

No sentido de avaliar a percepção dos visitantes relativamente à desertificação da Ilha de Porto Santo, questionou-se sobre se consideram que a Ilha sofreu degradação ambiental/desertificação. Ao que se constatou, 66% dos inquiridos respondem afirmativamente, 9% não concordam e os restantes 25% não sabem ou não respondem. Verificou-se que a maioria atribui este problema tanto a causas naturais como humanas (65%), embora relativamente aos inquiridos que consideram ser só

devido a uma delas a maior percentagem recai sobre causas humanas (11%) e apenas 8% atribuem a causas naturais. Saliente-se que cerca de 16% dos inquiridos não sabem ou não respondem à questão.

Tabela III.19 – Causas atribuídas ao processo de degradação do solo/desertificação na Ilha de Porto Santo.

Causas que os visitantes atribuem ao processo de degradação do solo / desertificação na Ilha de Porto Santo	N	(%)
• Construção sem planeamento	17	11,3
• Seca/aridez/falta de chuva	12	8,0
• Erosão/desgaste do solo	11	7,3
• Catástrofes naturais/alterações climáticas	8	5,3
• Passividade humana/Más praticas	8	5,3
• Desflorestação	7	4,7
• Paisagem degradada/abandono dos terrenos	7	4,7
• Ausência de vegetação/poucos espaços verdes	6	4,0
• Desenvolvimento pouco sustentado/interesses económicos	6	4,0
• Abandono da agricultura	5	3,3
• Solos inférteis/utilização excessiva dos solos	3	2,0
• Exploração de pedreiras/extracção de areias	3	2,0
• Pressão do turismo	2	1,3
• Poluição	2	1,3
• NS/NR	53	35,3
TOTAL	150	100,0

No que se refere às causas responsáveis pelo processo de degradação do solo/desertificação na Ilha, estas foram especificadas por 72% dos inquiridos (Tabela III.19), sendo as mais assinaladas: a “construção sem planeamento” (11%), seguido de “seca/aridez/falta de chuva” (8%) e “erosão/desgaste do solo” (7%). Entre 4 a 6% atribuem as causas a “catástrofes naturais/alterações climáticas”, “desflorestação”, “paisagem degradada/abandono dos terrenos”, “ausência de vegetação/poucos espaços verdes” e “desenvolvimento pouco sustentado/interesses económicos”. Uma percentagem menor de inquiridos referem ainda como causas o “abandono da agricultura”, “solos inférteis/utilização excessiva dos solos”, “exploração de pedreiras/extracção de areias”, “pressão do turismo” e a “poluição”. Contudo, é importante destacar que cerca de 35% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

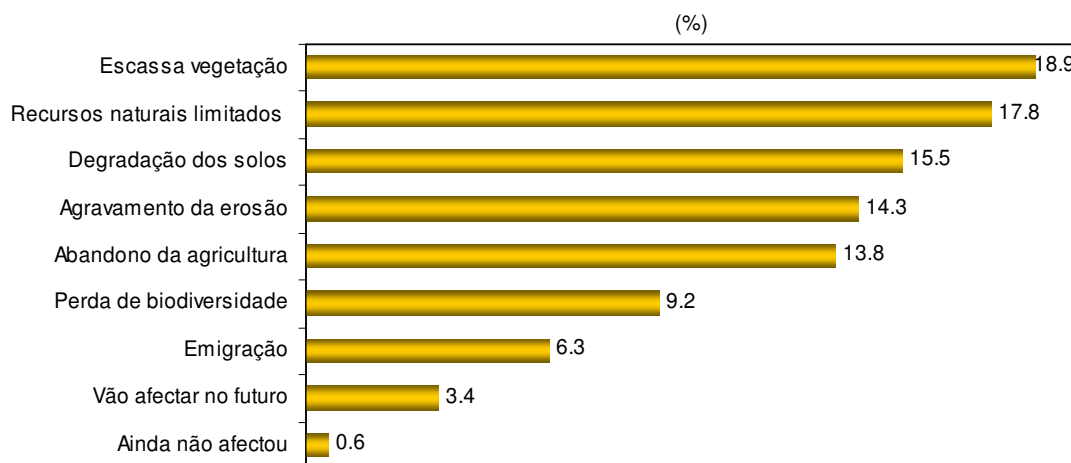


Figura III.39 – Resposta à questão “De que forma é que o processo de desertificação tem afectado a Ilha de Porto Santo?”.

Os inquiridos consideram que o processo de desertificação na Ilha tem afectado essencialmente a vegetação, tornando-a cada vez mais escassa (19%). Referem também outros factores afectados, nomeadamente: “recursos hídricos limitados” (18%), “degradação dos solos” (15%) e “agravamento da erosão” (14%). Outros aspectos apontados foram o “abandono da agricultura” (14%) e a “perda da biodiversidade” (9%). Com menor representatividade referem situações como a “emigração” (6%) e cerca de 3% dos visitantes é da opinião que irá afectar a Ilha no futuro (Figura III.39).

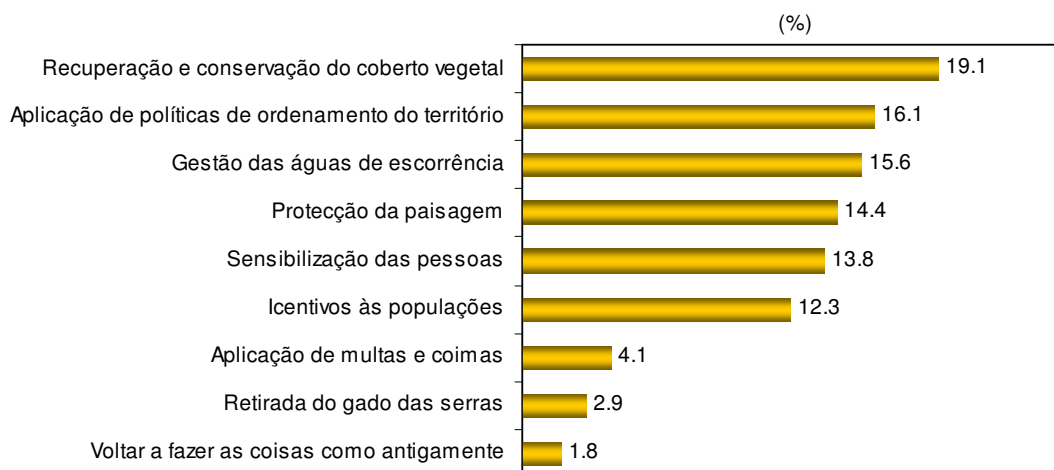


Figura III.40 – Resposta à questão “Quais as medidas necessárias para atenuar as consequências do processo de desertificação?”.

No que respeita às medidas necessárias a serem tomadas para atenuar as consequências do processo de desertificação, estas foram apontadas por 78% da população inquirida, que considera que as mais urgentes são: a “recuperação e conservação do coberto vegetal” (19%) bem como a “aplicação de políticas de ordenamento do território” (16%). Ainda como medidas mais importantes apontam a necessidade de: “gestão das águas de escorrência” (16%); a “protecção da paisagem” (14%), a “sensibilização das pessoas” (14%), e ainda fornecer “incentivos às populações”. Uma menor percentagem de turistas (3 a 4%) considera, ainda, importante haver a “aplicação de multas e coimas” e a “retirada do gado das serras” (Figura III.40).

Os visitantes consideram que os componentes ambientais mais afectados pela acção humana são a vegetação (22%), seguindo-se o solo (18%), o sistema dunar (17%), a paisagem (11%) e os recursos hídricos (11%). Como componente menos afectado consideram a fauna (10%).

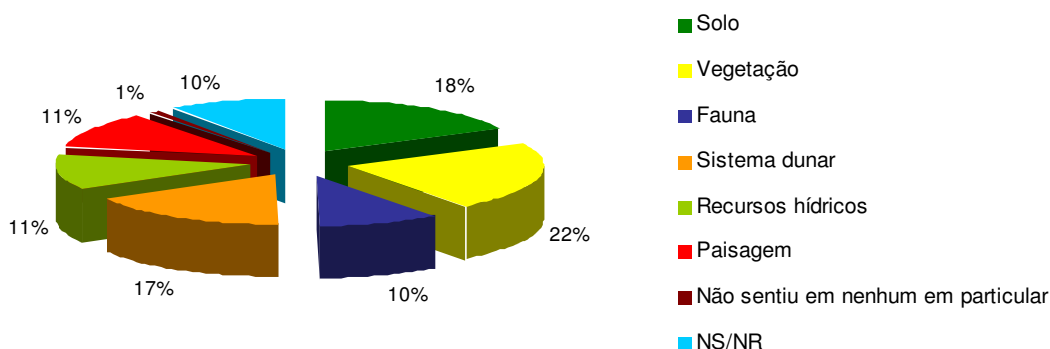


Figura III.41 – Componentes ambientais mais afectados pela acção humana.

Pretendeu-se ainda clarificar de que modo é que os visitantes consideram que a acção humana tem afectado cada uma das componentes ambientais, as principais razões apontadas pelos inquiridos são expostas de seguida.

A vegetação foi a componente ambiental considerada, pelos visitantes, como sendo a mais afectada pela acção humana. Deste modo, 12% dos inquiridos consideram que a acção humana tem contribuído para a “diminuição da biodiversidade /desaparecimento da vegetação/eliminação de endemismos”. Cerca de 9% responsabilizam a acção humana pela “florestação insuficiente”. Outros referem que a vegetação tem sido afectada essencialmente devido à impermeabilização dos solos (e.g. habitações, grandes empreendimentos hoteleiros, campo de golfe). Responsabilizam ainda a acção humana pela “falta de preservação da vegetação/má gestão”, “escassez de água/falta de rega durante o repovoamento florestal” e a “desflorestação ao longo dos tempos que contribuiu para o aumento da erosão”.

Saliente-se que, cerca de 30% dos inquiridos não assinalam esta questão, e 22% não sabem ou não respondem (Tabela III.20).

Tabela III.20 – Razões apontadas pelos visitantes sobre o modo como a acção humana tem afectado a vegetação.

<i>De que modo é que a acção humana tem afectado a vegetação?</i>	N	(%)
• Diminuição da biodiversidade/eliminação de endemismos	13	12,1
• Florestação insuficiente	10	9,3
• Impermeabilização dos solos (e.g. habitações, grandes empreendimentos hoteleiros, campo de golfe)	8	7,5
• Falta de preservação/má gestão	6	5,6
• Escassez de água/falta de rega durante o repovoamento florestal	5	4,7
• Desflorestação ao longo dos tempos contribuiu para aumento da erosão	5	4,7
• Abandono da agricultura	4	3,7
• Considera que a acção humana tem sido benéfica na preservação da vegetação através do repovoamento florestal	4	3,7
• NS/NR	30	28,0
• Não assinalou	22	20,6
TOTAL	107	100,0

As razões apresentadas para explicar os principais efeitos da acção humana sobre o solo foram: a “intensificação da erosão” (12%, note-se que a erosão é atribuída à prática de desportos radicais), a “construção sem planeamento”, a “falta de vegetação” e o “abandono da agricultura”. No entanto, cerca de 38% dos inquiridos não assinalam esta componente ambiental e 23% não sabem ou não respondem (Tabela III.21).

Tabela III.21 – Razões apontadas pelos visitantes sobre o modo como a acção humana tem afectado o solo.

<i>De que modo é que a acção humana tem afectado o solo?</i>	N	(%)
• Intensificação da erosão (e.g. desportos radicais com viaturas todo o terreno, circulação automóvel e motorizada)	12	12,0
• Construção sem planeamento (e.g. construção em zonas de risco)	6	6,0
• Falta de vegetação acentua continuamente a degradação do solo	6	6,0
• Abandono da agricultura	6	6,0
• Solo cada vez mais seco/árido/empobrecido	5	5,0
• Má gestão (e.g. exploração excessiva de pedreiras)	4	4,0
• NS/NR	23	23,0
• Não assinalou	38	38,0
TOTAL	100	100,0

No que respeita ao sistema dunar, as razões mais apontadas para explicar o modo como tem sido afectado pela acção humana, foram: a “pressão da construção junto ao cordão dunar ou sobre a duna (e.g. empreendimentos hoteleiros, bares, promenade)” (32%) e a “destruição ou desnudamento do cordão dunar (e.g. pisoteio, motociclos)” (7%). No entanto, cerca de 40% dos inquiridos não assinalam esta questão e 18% não sabem ou não respondem (Tabela III.22).

Tabela III.22 – Razões apontadas pelos visitantes sobre o modo como a acção humana tem afectado o sistema dunar.

<i>De que modo é que a acção humana tem afectado o sistema dunar?</i>	N	(%)
• Pressão da construção junto ao cordão dunar ou sobre a duna (e.g. empreendimentos hoteleiros, bares, promenade)	32	31,7%
• Destruição/desnudamento do cordão dunar (e.g. pisoteio, motociclos)	7	6,9%
• Má construção dos acessos / acessos clandestinos à praia	2	2,0%
• Falta de protecção	2	2,0%
• NS/NR	18	17,8%
• Não assinalou	40	39,6%
TOTAL	101	100,0%

As principais razões apontadas pelos visitantes (19% da população inquirida) sobre o modo como a acção humana tem afectado os recursos hídricos, foram: a “má gestão dos recursos hídricos/falta de investimento” (12%), “consumo excessivo de água devido à pressão turística ou para outros fins desnecessários” (5%), e a “impermeabilização dos solos/desvio dos cursos de água” (4%). Com menor expressão (entre 2 a 3%), referem a “destruição/extinção das nascentes de água (e.g. furos para detecção de água)” e, ainda, “a erosão e a falta de vegetação não permitem a retenção de água no solo”. Saliente-se que, cerca de 58% dos inquiridos não assinalam esta componente ambiental, e 16% não sabem ou não respondem.

A paisagem é também uma componente ambiental que, segundo os visitantes (15% dos inquiridos) é afectada pela acção humana, e mencionam como principal razão a “construção sem planeamento” (9%), uma vez que referem existir falta de preocupação no enquadramento das habitações. Com menor representatividade (3%), consideram a “paisagem não preservada/desequilibrada”, devido aos “solos nus e erosionados” e ainda “devido à não restauração e preservação de imóveis antigos e pontos turísticos”, como é o caso das casas típicas de salão, fontanários, moinhos de vento e a Fonte de Areia. Refira-se que, 42% dos inquiridos, não assinalam esta questão e 12% não sabem ou não respondem.

Relativamente ao modo como a acção humana tem afectado a fauna, apenas um reduzido universo de inquiridos emitiu opinião sobre este assunto (cerca de 12%), e apontam aspectos como: “diminuição da biodiversidade devido à escassez da flora”, “caça de espécies protegidas, como por exemplo a cagarra e aves de rapina” e “pesca ilegal (com recorrência a redes ou bombas)”. Cerca de 65% dos inquiridos não assinalam esta questão, e 19% não sabem ou não respondem.

III.3.6 Percepção dos visitantes face à valorização do coberto vegetal para o combate ao processo de desertificação

No intuito de perceber a importância atribuída à valorização do coberto vegetal na Ilha de Porto Santo, questionou-se sobre a importância desta ser uma boa medida no combate ao processo de desertificação, e verificou-se que na sua maioria os visitantes respondem afirmativamente (75%) contra cerca de 4% que respondem negativamente e 21% não sabem ou não respondem a esta questão. As razões apresentadas pelos visitantes para justificar importância do coberto vegetal como medida importante no combate à desertificação estão expostas na Tabela III.23.

Tabela III.23 – Razões apresentadas para justificar importância do coberto vegetal como medida importante no combate à desertificação.

<i>Considera que a valorização do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo possa ser uma medida importante no combate à desertificação? Porquê?</i>	N	(%)
• Protege os solos da erosão / boa conservação e estabilização do solo	29	22,8
• O coberto vegetal contribui para o aumento da pluviosidade / retenção de água nos solos / manutenção de aquíferos	21	16,5
• É a medida mais adequada para combater a desertificação e uma mais valia para o ambiente da Ilha	11	8,7
• Ajuda no aumento da biodiversidade animal e vegetal	9	7,2
• Importante para potenciar condições ao nível do turismo aliado às condições ímpares da praia	5	3,9
• É importante que haja investimento na florestação	4	3,1%
• NS/NR	48	37,8%
TOTAL	127	100,0%

Verifica-se assim, que as principais razões apresentadas pelos inquiridos referem-se ao facto desta medida permitir: a “protecção dos solos da erosão/boa conservação e estabilização do solo” (23%) e “contribuir para o aumento da pluviosidade/retenção de água nos solos/manutenção de aquíferos” (17%). Cerca de 11% referem o facto desta ser uma medida adequada para combater a desertificação e ainda ser uma mais

valia para o ambiente da Ilha e 9% mencionam a “ajuda no aumento da biodiversidade”. Com menor representatividade (3 a 4%) consideram que esta é uma medida “importante para potenciar condições ao nível do turismo aliado às condições ímpares da praia”, e outros mencionam que deveria haver “investimento na florestação”. Saliente-se que cerca de 37% dos inquiridos não sabem ou não respondem a esta questão.

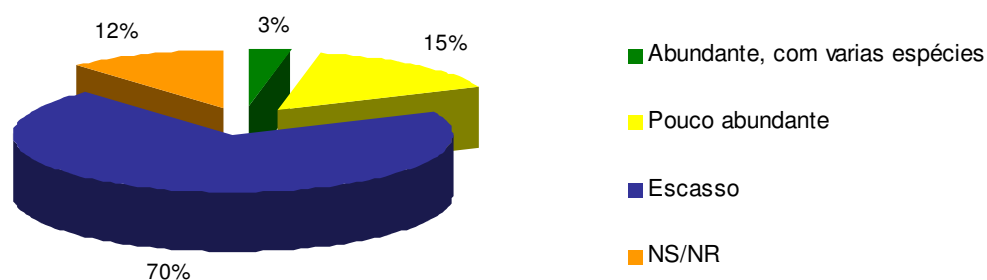


Figura III.42 – Resposta à questão “Como classifica o coberto vegetal da Ilha de Porto Santo?”

No que respeita à caracterização que os visitantes fazem do coberto vegetal da Ilha, constatou-se que 70% dos inquiridos classificam-no como “escasso”, 15% classificam-no como “pouco abundante” e apenas 3% como “abundante”. No entanto, 12% não sabem ou não respondem à questão (Figura III.42).

Relativamente às zonas mais florestadas actualmente, os visitantes identificam, na maioria, as “zonas montanhosas” (68%), embora, 15% consideram também as “zonas costeiras” como sendo as mais florestadas/arborizadas. Contudo cerca de 13% não sabem ou não respondem a esta questão (Figura III.43).

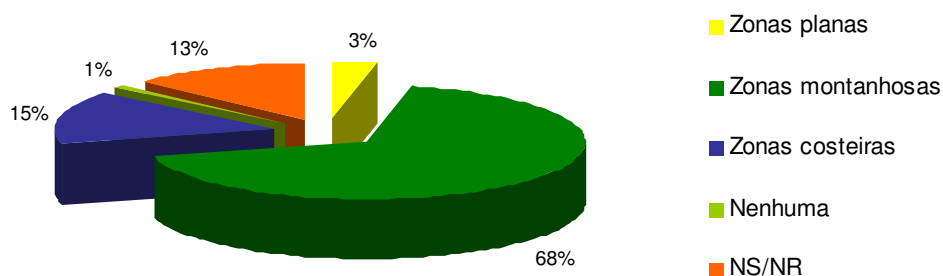


Figura III.43 – Resposta à questão “Quais as zonas mais florestadas/arborizadas, actualmente?”.

No que concerne à opinião dos inquiridos quanto à utilização de espécies nativas no repovoamento florestal da Ilha, mais de metade dos inquiridos (66%) é de opinião de que seria importante utilizar estas espécies, embora 17% afirmem nunca terem

pensado no assunto, 2% respondem negativamente e 15% não sabem ou não respondem. Os inquiridos indicam como espécies nativas que devem ser utilizadas no repovoamento vegetal o dragoeiro, a oliveira brava e o zimbro. Assinalam ainda outras espécies exóticas como a palmeira e o pinheiro bravo (Tabela III.24). Verificou-se, contudo, que cerca de 85% dos visitantes não sabem ou não respondem a esta questão, o que poderá ser compreensível, considerando o facto de que provavelmente, não conhecem as espécies nativas da Ilha.

Tabela III.24 – Espécies nativas, indicadas pelos inquiridos, que devem ser usadas no repovoamento florestal.

<i>Quais as espécies nativas que devem ser usadas no repovoamento florestal?</i>	N	(%)
• Dragoeiro	4	3,9
• Oliveira brava	4	3,9
• Zimbro	2	2,0
• Palmeira	2	2,0
• Pinheiro Bravo	2	2,0
• NS/NR	86	85,1
TOTAL	101	100,0

Apesar de existir uma grande percentagem de visitantes que não conhece as espécies nativas da Ilha de Porto Santo, como é possível constatar pela Tabela III.24, foram apresentadas razões por 68% da população inquirida para justificar a utilização de espécies nativas no repovoamento florestal (Tabela III.25). Assim as principais razões apontadas foram: a) o facto de serem “espécies que podem ser mais resistentes/mais adaptadas às condições agrestes da Ilha (e.g. seca)” (20%), b) para a “preservação das espécies nativas/conhecimento das árvores originais da Ilha/recuperação da paisagem tradicional” (16%) e, c) por serem “espécies nativas já estão adaptadas (e.g. promovem a boa estabilização do solo, boa aclimatização, melhor integração no meio)” (11%). Outras razões apontadas foram o facto das “árvores nativas poderem crescer mais rapidamente/possibilidade de regeneração natural” e a “importância da utilização de espécies nativas para restabelecer o equilíbrio do coberto vegetal do passado”. Uma pequena percentagem de inquiridos (5%) responde que não concorda com a utilização de espécies nativas no repovoamento florestal, justificando esta resposta com o facto de considerar “ser preferível experimentar plantar novas espécies adaptadas ao clima da Ilha”. Ainda 35% não sabem ou não respondem a esta questão.

Tabela III.25 – Razões apresentadas pelos visitantes para justificar a importância da utilização de espécies nativas no repovoamento florestal.

Porquê?	Considera ser uma medida importante, utilizar espécies nativas no repovoamento florestal?				Total	
	Sim		Não			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
• Espécies que podem ser mais resistentes/mais adaptadas às condições agrestes da Ilha (e.g. seca)	19	21,6	-	-	19	20,4
• Preservação das espécies nativas/conhecimento das árvores originais da Ilha/recuperação da paisagem tradicional	15	17,0	-	-	15	16,1
• As espécies nativas já estão adaptadas (e.g. boa estabilização do solo, boa aclimatização, melhor integração no meio)	10	11,4	-	-	10	10,8
• As árvores nativas irão crescer mais rapidamente/possibilidade de regeneração natural	3	3,4	-	-	3	3,2
• Importante a utilização de espécies nativas para restabelecer o equilíbrio do coberto vegetal do passado	2	2,3	-	-	2	2,2
• É preferível experimentar plantar novas espécies adaptadas ao clima da Ilha	-	-	5	100,0	5	5,4
• NS/NR	26	37,7	-	-	26	35,1
Total	88	100,0	5	100,0	93	100,0

No caso específico da espécie nativa oliveira brava ou zambujeiro (*Olea maderensis*), 47% dos inquiridos afirmam não conhecer esta espécie e 36% afirmam conhecer, ainda 17% não sabem ou não respondem a esta questão.

No que concerne à opinião dos inquiridos sobre se a oliveira brava é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da Ilha, apenas 46% emitem opinião, sendo que, destes, 40% concordam com a reintrodução da oliveira brava na reflorestação, e os restantes 6% não sabem ou não respondem à questão.

Os inquiridos que concordam, apresentam razões para justificar o facto desta ser uma boa espécie para ser utilizada na florestação da Ilha (Tabela III.26), como por exemplo: ser uma “espécie endémica/nativa” (27%) e o facto de ser “espécie nativa, tem uma melhor adaptação no habitat natural/maior probabilidade de sobrevivência” (20%) e ainda, por ser uma “espécie muito resistente à seca/aridez” (9%). Com menor frequência (2 a 3%) foram apresentadas as seguintes razões: contribui para o “aumento da biodiversidade, por ser uma árvore de grande longevidade” e “protege o solo da erosão”. Saliente-se que cerca de 35% não sabem ou não respondem a esta questão.

Tabela III.26 – Razões apresentadas pelos visitantes, para justificar que a oliveira brava é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da Ilha.

<i>Na sua opinião, a oliveira brava ou zambujeiro é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da Ilha? Se sim, porquê?</i>	N	(%)
• É uma espécie endémica/nativa	15	27,3
• As espécies nativas adaptam-se melhor no habitat natural/maior probabilidade de sobrevivência	11	20,0
• É uma espécie muito resistente à seca/aridez	5	9,1
• Se for utilizada em pequenas fracções, mas deverão também apostar em culturas alternativas, não tradicionais	2	3,6
• Por ser uma árvore com grande longevidade irá contribuir para o aumento da biodiversidade da fauna	2	3,6
• Protege o solo da erosão	1	1,8
• NS/NR	19	34,5
TOTAL	55	100,0

Afim de aprofundar o grau de conhecimento da população inquirida, e após referir que os ensaios de propagação da oliveira brava por métodos tradicionais (estacaria e sementeira) se têm mostrado pouco eficazes, questionou-se sobre a concordância da aplicação de outros métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas) para ajudar o processo de reflorestação. Perante esta questão, apenas 47% dos visitantes inquiridos emitem uma opinião, destes, 31% mostram concordância, 4% não concordam, 6% afirmam nunca terem pensado no assunto e 7% não sabem ou não respondem à questão.

Foi ainda pedido à população inquirida que justificasse a sua concordância ou discordância com a aplicação de métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas) para ajudar o processo de reflorestação, tendo sido apresentadas razões por apenas 34% dos visitantes, e destes 50% não sabem ou não respondem à questão (Tabela III.27). Apesar do reduzido universo de inquiridos que emitiu uma opinião, constatou-se que 13% referem que “é importante a existência de novos métodos porque é urgente a necessidade de reflorestação da Ilha”, 11% afirmam que “se os métodos são eficazes e podem beneficiar, é importante utilizá-los na reflorestação da Ilha” e ainda que “se pelos métodos tradicionais é difícil, estes métodos podem ser mais rápidos na propagação da espécie e na resolução do problema”. Outros aspectos referidos têm a ver com o facto de serem importantes métodos para a preservação da espécie. Cerca de 9% dos inquiridos não concordam com a aplicação destes métodos porque “consideram que a clonagem de plantas não é adequada para o problema em causa”.

Tabela III.27 – Razões apresentadas pelos visitantes para justificar a concordância ou discordância com a aplicação de métodos mais avançados (e.g. micropropagação de plantas) para ajudar o processo de reflorestação.

Porquê?	Concorda com a aplicação de métodos mais avançados (micropropagação) para ajudar a reflorestação?				Total	
	Sim		Não			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
• É importante a existência de novos métodos porque é urgente a necessidade de reflorestação da Ilha	6	14,3	-	-	6	13,0
• Se os métodos são eficazes e podem beneficiar, é importante utilizá-los na reflorestação da Ilha	5	11,9	-	-	5	10,9
• Se pelos métodos tradicionais é difícil, estes métodos podem ser mais rápidos na propagação da espécie e na resolução do problema	5	11,9	-	-	5	10,9
• Para preservação da espécie	2	4,8	-	-	2	4,3
• Acredita na aplicação de novas técnicas	1	2,4	-	-	1	2,2
• A micropropagação é um método excelente de reprodução	1	2,4	-	-	1	2,2
• A utilização de novos métodos é importante, mas também deverá ser aplicada a outras espécies nativas	1	2,4	-	-	1	2,2
• Considera que a clonagem de plantas não é adequada para o problema em causa	-	-	4	100,0	4	8,7
• NS/NR	21	50,0	-	-	21	45,7
Total	42	100,0	4	100,0	46	100,0

III.3.7 Percepção das entidades e dos especialistas face à desertificação e à importância da valorização do coberto vegetal

No sentido de conhecer a perspectiva das entidades regionais e locais que actuam nesta área, bem como de alguns especialistas, foram realizados inquéritos por entrevista (IE) que permitam fazer uma análise da visão institucional e técnica. Assim foram realizadas entrevistas a várias entidades, nomeadamente: o Secretário Regional do Ambiente e Recursos Naturais (SRARN), o Director Regional de Florestas (DRF), o Director do Jardim Botânico da Madeira (DJBM), o Presidente da Câmara Municipal de Porto Santo (PCMPS) e o Presidente da Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo (PSDPS). Relativamente a especialistas no âmbito desta temática, foram entrevistados um Eng.º Agrónomo Reformado da Função Pública (EA) (antigo Director

do Jardim Botânico da Madeira e Presidente da Junta Geral do Distrito Autónomo do Funchal) e um Mestre Florestal da Estação Florestal de Porto Santo (MF).

A estrutura da entrevista visou a identificação da relevância que as entidades e os especialistas atribuem a um conjunto de questões sobre a temática da desertificação e valorização do coberto vegetal, nomeadamente:

- a) Identificação da Ilha como área sujeita à desertificação;
- b) Causas da desertificação;
- c) Acções/medidas para melhorar a situação;
- d) Caracterização do coberto vegetal;
- e) Utilização de novas metodologias (e.g. micropropagação de plantas) para a minimização do processo de desertificação;

Na análise das perspectivas apresentadas pelas entidades e pelos especialistas relativamente aos aspectos de desertificação na Ilha de Porto Santo, verificou-se que existem pontos de vista e opiniões distintas consoante as questões feitas, embora nalguns aspectos se tenha verificado a existência de concordância. De seguida serão expostos alguns pontos de vista das entidades e dos especialistas entrevistados de acordo com a estrutura do IE.

a) Identificação da Ilha como área sujeita à desertificação

Existe um consenso na identificação do problema no que se refere ao facto de na generalidade os entrevistados concordarem que a Ilha é uma área ambientalmente sensível, ou seja, que sofreu um processo de desertificação ao longo do tempo, havendo uma homogeneidade na resposta relativamente ao facto da Ilha ser pequena e como tal, um ecossistema mais sensível. Contudo alguns dos entrevistados, nomeadamente o SRARN e o DJBM, não concordam com o termo desertificação para caracterizar a situação actual da Ilha.

Na visão do SRARN: *“O Porto Santo como Ilha e pequena que é, é naturalmente um ecossistema sensível, e depois tem e sofre disso em termos de condições naturais, nomeadamente ao nível do seu coberto vegetal,... E depois atendendo às dificuldades específicas do território, para além dessas, não diria desertificação, mas essas dificuldades tem a ver com o tipo de ocupação do território, que tem uma grande vantagem em relação à Madeira, uma vez que tem uma menor densidade populacional (...).”*

O DRF considera que a Ilha de Porto Santo sofreu um processo de desertificação ao longo do tempo. Já o DJBM refere que: *“A Ilha é uma área sensível porque é uma Ilha extremamente pequena e que sofreu um processo erosivo acentuado nos últimos tempos devido à destruição do coberto vegetal natural.”* Quanto ao facto da Ilha ter sofrido desertificação ao longo do tempo, refere o seguinte: *“Não diria bem desertificação mas sim destruição do coberto vegetal natural, erosão ou escassez de água. Falar em desertificação talvez não seja o termo mais correcto, desertificação tem a ver com o desaparecimento do coberto vegetal, com o desaparecimento de plantas adaptadas a determinado tipo de condições, grande aridez, pouca quantidade de água. O Porto Santo segundo a classificação dos bio-climas, faz parte do bio-clima mediterrânico e não do deserto ou sub-deserto, que é outra classificação de climas a nível mundial, agora desertificação no sentido geral e vulgar da palavra podemos considerar nesse sentido, agora no sentido mais biológico mais científico talvez veria qual seria o termo mais adequado.”*

Relativamente à percepção do DJBM sobre a desertificação na Ilha de Porto Santo, verifica-se que apesar de não considerar o termo desertificação o mais adequado para caracterizar a actual situação, identifica a ocorrência de alguns fenómenos na Ilha, nomeadamente a erosão, a destruição do coberto vegetal e a escassez de água.

O PCMPS afirma que: *“ (...) tendo em conta a dimensão de Porto Santo e a especificidade da Ilha pode-se considerar uma área ambientalmente sensível.”* e acrescenta ainda que concorda com a existência de zonas que estão degradadas com o solo empobrecido e com pouca vegetação. Refere ainda relativamente à Ilha que: *“ (...) existe toda uma envolvimento em termos da sua morfologia e orografia, e qualquer intervenção ou acção, por parte do homem numa área como esta, se torna visível e vai ter claramente um impacto muito grande. E se não se tratar de intervenções cuidadas com alguma qualidade, ou se for uma intervenção desajustada para o local, terá evidentemente repercussões que depois não se conseguem controlar e perde-se efectivamente a caracterização que é habitual de Porto Santo.”*

O PSDPS, concorda dizendo que: *“ (...) basta conhecer a Ilha, algumas zonas da Ilha onde a erosão é um facto e que se vê à vista desarmada, e por isso julgo que a opinião geral é que a Ilha sofreu um processo de desertificação e desgaste das encostas.”*

Relativamente à visão do EA, na identificação da Ilha como área sensível que sofreu desertificação, este afirmou o seguinte: *“Eu acho que sim, de um modo geral diz-se que as Ilhas são bastante sensíveis, não só pela sua dimensão, mas também pela sua orografia, pelos microclimas que têm, por terem normalmente uma flora e uma fauna*

características, às vezes com muitas espécies endémicas que, no caso de se tornarem muito povoadas, ficam muito sujeitas ao desaparecimento ou à diminuição gradual de muitas espécies. O arquipélago da Madeira, no qual se inclui o Porto Santo, é uma região com muitos endemismos e uma flora indígena bastante significativa, ... há muitas dessas espécies características e exclusivas da Madeira ou de Porto Santo, que têm uma representação relativamente pouco numerosa, são espécies que são limitadas a determinados habitats e portanto estão representados por um pequeno número de exemplares. Se houver qualquer alteração por motivos, seja de variações climáticas, seja de densidade de população, podem vir a sofrer um processo de extinção em relativamente pouco tempo, daí se poder dizer, que uma Ilha, neste caso o Porto Santo, é de facto do ponto de vista ambiental um território muito sensível.

Quanto ao facto da ilha ter sofrido um processo de desertificação, afirma que: “se pode falar de facto em desertificação na Ilha, ... mas não com aquele sentido de que ocorreu devastação intensa ou desaparecimento total da vegetação da Ilha, mas sim que havia uma determinada vegetação arbórea no Porto Santo e arbustiva obviamente, mas a arbórea era a mais visível, e portanto, muita dessa vegetação desapareceu. Conforme o próprio diz: “Bem, eu não estou muito de acordo em que o Porto Santo fosse uma Ilha vegetacionalmente muito densa. As espécies que se consideram, sobretudo do ponto de vista, do estrato arbóreo, não são espécies que formam grandes plantações, não há florestas de zimbriões, não há florestas de marmulanos, não há florestas de dragoeiros, há populações mais ou menos numerosas”. Refere ainda que ao: “aplicar-se o termo desertificação tem que se fazer mais no sentido de intenso desaparecimento de espécies essencialmente pelo seu aproveitamento, quer no caso do dragoeiro, o sangue de drago, quer no caso do zimbrião das lenhas e das madeiras.” (EA).

O MF, relaciona a desertificação com o sobrepastoreio que degradou em parte os solos da zona Norte da Ilha, uma vez que, quando se questionou sobre se a Ilha teria sofrido um processo de desertificação, a sua resposta foi a seguinte: “Neste momento estão a ser efectuados trabalhos para alterar toda esta situação que ao longo dos anos foi fustigando, degradando, na medida em que não havia ordenamento, em especial do pastoreio. Portanto, a partir do ano de 1995 saiu um Decreto-lei a nível Regional, e também através das normas comunitárias para ser retirado o gado, ou seja para que fosse feita uma redução no gado caprino e ovino.” Referiu que essas zonas degradadas existem, “não só devido ao gado mas também devido à seca, que tem fustigado a Ilha, é portanto uma zona sensível, que merece a atenção das entidades competentes.” (MF).

b) Causas da desertificação

É consensual na opinião dos entrevistados, que a destruição do coberto vegetal foi uma das principais causas responsáveis pelo processo de desertificação na Ilha de Porto Santo, tendo contudo sido referidas outras causas pontuais.

As causas identificadas pelo DRF, como responsáveis pelo processo de desertificação, são as seguintes: “ (...) primeiro a necessidade de material combustível numa Ilha isolada que levou à desflorestação durante séculos. A agricultura intensiva de cereais, sem rotação, que esgotaram os solos. O pastoreio desregrado e selvagem que durante séculos existiu na Ilha. E mais recentemente a existência de comunidades excessivas de coelhos bravos em algumas zonas.”.

No caso do DJBM, embora não concorde com o uso do termo “desertificação” para caracterizar a situação de Porto Santo, considera a existência de factores responsáveis pela destruição do coberto vegetal e o agravamento da erosão, nomeadamente causas humanas: “É notório que um dos factores que levou também à destruição da vegetação foi a introdução de animais exóticos, o coelho, a cabra e a própria instalação do homem na Ilha, teve a necessidade de ter fontes de combustível e outra matéria prima, claro que destruiu aquilo que tinha mais à mão que neste caso era a floresta e o tipo de vegetação que lá existia. O Porto Santo como também é uma Ilha relativamente baixa, recebe, ou pelo menos não é captada com grande abundância como é na Madeira, a água que vem nos nevoeiros que é trazida pelos ventos alísios, é por isso que também é uma Ilha que certamente nunca teve grande abundância de água, e por isso qualquer intervenção ao nível do coberto vegetal faz um grande efeito, ou seja, faz sentir algum desequilíbrio na Ilha o que provoca um conjunto interligado de rede de factores, etc. que leva logo à destruição.”.

Na óptica do PCMPS, as causas da desertificação são atribuídas principalmente à seca e à falta de plantação de árvores, como se depreende das suas palavras: “A seca, as secas prolongadas, ... durante muitos anos não houve preocupação em se plantarem árvores, houve a preocupação de plantação de árvores no Pico do Castelo por volta da década de 50 e depois nunca mais se fez nada. ... Houve aqui um período em que não houve plantação de qualquer tipo de árvores e veio depois a se revelar uma medida que não foi tomada e que trouxe consequências graves para o Porto Santo. Depois na década de 70 e 80, começa-se novamente a plantar mais árvores, já depois do 25 de Abril, e efectivamente nos últimos anos não se conseguiu plantar. Agora neste momento, eu acho que as principais causas, é o facto de não ter existido, durante um determinado período, essa preocupação de plantação de árvores, as secas prolongadas e a falta de sensibilidade das pessoas, uma vez que, além das palmeiras, pouco mais se plantava, os próprios serviços florestais, que na altura

não sei se existiam. Portanto todos estes factores reunidos, levaram a que efectivamente o coberto vegetal fosse reduzido, e que em determinadas zonas não houvesse praticamente nada.”

O PSDPS atribui as causas principalmente à erosão hídrica e eólica: “ (...) o facto de Porto Santo ter um regime de chuvas torrenciais, não chove de uma forma regular ou não tem chovido ao longo dos tempos, e quando chove é torrencialmente e portanto isso provoca um desgaste grande, de forma que se vêem os sulcos causados pelas chuvas em todo o lado. Estou a lembrar-me, nomeadamente, das encostas do Pico de Ana Ferreira e nas encostas do Penedo do Sono, e julgo que esse será o factor mais importante. Naturalmente que isso terá a ver também com as características da Ilha e com o solo, uma vez que nalgumas zonas se verifica um solo relativamente frágil, fragmentado e quase arenoso, naturalmente sem grande resistência às chuvas e eventualmente também à erosão do vento.” Acrescenta ainda: “...naturalmente que se houvesse um coberto vegetal maior, ao nível de grandes arbustos e árvores, isso serviria para conter mais os solos.”

O EA refere que a desertificação na Ilha poderá ser atribuída a causa humana no que diz respeito ao desaparecimento de algumas espécies vegetais nativas, contudo considera ainda a existência de outros factores, conforme diz: “Houve ainda um factor importante, e esse está documentado, é importante salientar, que o Porto Santo teve um inimigo feroz em conjunto com o homem que foram os coelhos e todo gado, que foi criado ao ar livre para o sustento das primeiras populações que viveram no Porto Santo. Até porque para os exemplares jovens que se produziam naturalmente na Ilha, como pequenos dragoeiros, pequenos zimbriros, pequenos marmulanos, etc. essencialmente o coelho e a cabra, foram elementos destruidores de grande importância. Portanto acresce ao aproveitamento das árvores, fosse para indústria (no caso do sangue de drago), fosse para madeiras de construção ou lenhas de combustível, etc. há a acrescentar todo o prejuízo feito na natureza e portanto causa dessa desertificação, a existência de animais criados ao ar livre ou que foram deixados em liberdade pelas serras, como é o caso do coelho, e que fizeram uma destruição tremenda e que ainda hoje se faz sentir.”

Relativamente à opinião do MF este considera como principais causas o pastoreio, a seca e a erosão hídrica, quando ocorrem as grandes chuvadas.

c) Acções/medidas para melhorar a situação

Uma vez que o principal factor identificado pelas entidades e especialistas entrevistados, como principal responsável pela desertificação ou agravamento da erosão, foi a destruição do coberto vegetal e ainda a seca, referida por alguns, as

medidas que apresentam, de um modo geral, vão no sentido de melhorar estas situações.

Deste modo o SRARN, abordou essencialmente o problema da falta de água na Ilha, seja para rega ou água potável: “ (...) no Porto Santo foi possível passar de uma situação de extrema precariedade e dificuldade para um território de excelência, posso dar um exemplo: ao nível da água potável e de saneamento básico, temos hoje aquelas que são certamente as melhores taxas do país, quando há poucos anos tínhamos certamente as piores. ... Toda a gente se lembra das dificuldades de abastecimento de água, particularmente no Verão, quer pelo Verão quer pela presença do número acrescido de pessoas na Ilha, ... hoje temos uma taxa de cobertura de 100%, que é ... inédita no próprio território nacional. Ao nível das águas residuais ... há poucos anos havia extrema dificuldade e hoje é um território de referência, porque tem taxa de cobertura de 100%. Para além disso, um outro aspecto particularmente importante e de referência também, até pelos bons princípios, que é o facto de estarmos a reciclar totalmente essa água, e deste modo temos: cobertura total, reciclagem total, reutilização total, para resolver um dos estigmas tradicionais de Porto Santo, que é a falta de água.”

Neste contexto, referiu ainda que: “ (...) o governante não deve ficar por crédito, deve-se preparar para o pior cenário e estamos já a preparar um conjunto de acções para enfrentar situações de seca ... quando não há água da chuva, é ter água por mão humana e este fenómeno começa por ter origens de água, e o Porto Santo hoje está muito melhor porque as origens de água, particularmente, por causa da reciclagem de águas residuais foi fortemente aumentada. Além disso a capacidade da central dessalinizadora também está a ser fortemente incrementada. Por último, aos poucos, nós esperamos que a dessalinização da água, particularmente para fins não humanos se vá tornando também numa alternativa, porque as tecnologias melhoram e o preço torna-se mais compatível.” (SRARN).

No que se relaciona com medidas de florestação da Ilha, afirmou o seguinte: “Evidentemente que ao nível florístico, ... não é um território tão exuberante como é o da Madeira, mas por isso também se fizeram alguns projectos, já com dezenas de anos, nomeadamente de florestação e que têm dado bons resultados, penso que hoje é marcante a diferença nalgumas áreas de Porto Santo, mas que precisam de ser continuados, aliás temos já aprovados projectos para continuar os trabalhos de reflorestação. Foi possível fazer no Pico Branco, que é um sítio de referência, também um projecto de recuperação daquela área incluindo equipamento para construção de uma casa que vai servir para educação e sensibilização ambiental. O Porto Santo é um território difícil, mas também é um território com potencialidades e como quer as pessoas, quer as instituições estão interessadas em valorizá-lo, penso que temos dado passos em frente, e mais que um território difícil, já é hoje um território exemplar.” No que se refere à diversificação da flora nos projectos de reflorestação referiu: “Sim, diversificar ao máximo dentro daquilo que as condições naturais

proporcionam, diversificar só colocando espécies por espécies só para diversificar, vamos diversificar dentro daquilo que a natureza comporta.” (SRARN).

O DRF referiu no âmbito das medidas necessárias para atenuar as consequências do processo de desertificação da Ilha, o seguinte: *“Atenuar as zonas mais degradadas ao nível do solo, através da instalação de espécies exóticas pioneiras, que permitam criar condições para o melhoramento do solo, criando microclimas. Nestes locais, criar infra-estruturas que permitam uma actuação com sucesso como a instalação de pontos de água, a abertura de caminhos florestais ou ainda a implementar uma correcção torrencial nas linhas de água mais erosionadas. E, por outro lado recuperar a vegetação indígena de Porto Santo, nos locais onde essa recuperação é possível, através de trabalhos de reprodução e introdução de espécies indígenas e endémicas da flora de Porto Santo.”.*

Acrescentou ainda: *“Quanto às prioridades de florestação estas prendem-se essencialmente com zonas em que os processos erosivos são preocupantes e onde não existe nenhum tipo de vegetação, como é o caso do Pico do Concelho. Claro que a intervenção fica bastante condicionada aos terrenos propriedade do Governo Regional, pois a intervenção por parte do Governo Regional fica condicionada à aquisição dos terrenos em causa. Com este trabalho não esquecemos o constante acompanhamento e os trabalhos contínuos de manutenção que têm que ser realizados em áreas que já foram florestadas, trabalhos estes que têm vindo a ser realizados ao longo de várias décadas.” (DRF).*

Uma medida importante a ser tomada para a manutenção das plantações de árvores efectuadas é a existência de uma boa gestão dos sistemas de rega, tendo o DRF referido relativamente a este assunto, que: *“A rega é sem duvida um factor limitante das plantações efectuadas. Hoje a instalação de plantas tem obrigatoriamente que prever a rega das plantas. Nos projectos florestais realizados actualmente pela DRF, prevê-se sempre a construção de reservatórios de água para garantir a rega das plantas, principalmente na época estival. Estes reservatórios devido à tela que possuem como cobertura permitem a adução de água das chuvas. Em alguns locais específicos como é o caso do Pico Concelho prevê-se, e é financeiramente rentável, a instalação de um sistema automático de rega das cerca de 7000 mil plantas instaladas.”.*

No que se refere ao esforços desenvolvidos para recuperação do coberto vegetal, o DJBM indicou algumas medidas que têm sido tomadas ao longo do tempo, e algumas das que estão a decorrer actualmente: *“Em primeiro lugar continuar o esforço de rearborização de algumas áreas no Porto Santo e isso tem sido levado a cabo, desde há dois séculos atrás, temos o exemplo do Pico Castelo e doutros picos no Porto Santo, depois nos anos 70, início de 80 foram expandidos a outras áreas de Porto Santo a arborização, principalmente com duas espécies, principalmente com Pinus halepensis. Hoje em dia, ... os esforços têm sido conduzidos para uma diversificação de espécies, para não existir apenas uma monocultura, dado os perigos que advêm de haver apenas uma única espécie a ser*

utilizada no Porto Santo. Portanto, até já há a introdução de algumas espécies que são indígenas, algumas não com origem no próprio Porto Santo, mas com origem em material da Madeira, mas que provavelmente existiram no Porto Santo, dou o exemplo da *Myrica faya*, que está sendo utilizada no Porto Santo (...)" (DJBM).

Relativamente às medidas/acções que têm sido tomadas pelo Jardim Botânico da Madeira no sentido de ajudar nos processos de reflorestação da Ilha de Porto Santo, essencialmente com espécies indígenas, o DJBM falou um pouco sobre os trabalhos que desenvolvem, referindo que: *"O primeiro factor é ... o conhecimento e o estudo das espécies que existem no Porto Santo, quer as espécies que foram introduzidas quer principalmente as espécies indígenas e dentro das indígenas as endémicas. Fazer uma monitorização, ou seja, anualmente ou em determinados intervalos de tempo, saber o que está acontecendo com algumas populações de espécies mais raras, verificar se a área está a aumentar ou a diminuir, etc. ... Temos um trabalho que é feito todos os anos de recolha de sementes das espécies endémicas e das indígenas de Porto Santo e também do estudo que foi realizado à pouco tempo sobre as associações, sobre a vegetação de Porto Santo. Depois foi desenvolvido um projecto LIFE, de conservação de espécies vegetais raras e prioritárias do Arquipélago da Madeira e em que uma grande parte das acções é a recuperação do coberto vegetal natural do Pico Branco. Estamos a utilizar todas as metodologias para apenas utilizar material vegetal com origem no próprio Pico Branco, ou então no Porto Santo, a prioridade é nunca introduzir material genético com outra origem sem ser o da própria Ilha de Porto Santo. E então é um trabalho extremamente difícil de concretizar, devido às condições existentes no Porto Santo. ... nós não estamos apenas a propagar espécies arbóreas, mas também as arbustivas e herbáceas perenes. Isso irá processar-se do seguinte modo: nas zonas onde existem clareiras, onde morreram os *Cupressus macrocarpa* e os *Pinus halepensis*, onde temos solo, nós iremos colocar os marmulanos, oliveiras, adernos, portanto as espécies arbóreas, e nalgumas áreas, vamos fazer também sementeiras de espécies arbustivas, mas também cultivar plantas arbustivas e herbáceas, que é para haver núcleos que consigam sobreviver e que depois consigam produzir sementes viáveis, de modo a aumentar rapidamente o coberto vegetal desta zona."* (DJBM).

Relativamente ao trabalho que tem vindo a ser desenvolvido, o PCMPS afirmou o seguinte: *" (...) todos nós reconhecemos o trabalho que tem sido feito pela DRF, o número de árvores que tem sido plantado na Ilha de Porto Santo, embora infelizmente nos últimos anos não se tem conseguido plantar o número que se pretendia, inicialmente o estudo que foi feito apontava para a uma plantação com números entre as 60 e 70 mil árvores por ano, e portanto nos últimos 3-4 anos não se conseguiu fazer isso. Mas, tem sido feito um esforço muito grande para com essa plantação contribuir, para que os terrenos e a Ilha não estejam tão desertificados. Não há duvida que ainda há um trabalho muito grande para fazer, não só por parte dos serviços florestais, mas também pela própria população em geral. ... e portanto, tem*

que haver a preocupação, não só das próprias entidades públicas, mas também por parte dos privados em criar à sua volta o tal coberto vegetal que torna o Porto Santo menos árido.”.

Uma outra medida importante que permitiria alargar o repovoamento florestal na Ilha, seria fazer a expropriação de terrenos particulares que se encontram actualmente em estado de degradação biofísica, afim de serem declarados de utilidade pública. Perante esta situação e relativamente ao papel que a autarquia poderia ter a este nível, o PCMPS referiu que: *“Em determinado período, existiram uns programas comunitários que davam apoios, e a utilidade pública continuava a ser dos donos, mas estes teriam que plantar árvores e recebiam uma quantia. Algumas pessoas participaram, mas nem todas quiseram. O expropriar não é fácil, porque neste momento a Câmara não teria verbas para entrar numa situação dessas, nem sei se o próprio Governo Regional terá. O Governo Regional adquiriu muitos terrenos no Porto Santo, em determinado período, não os tem ainda todos reflorestados, e eu penso que seria melhor aproveitar esses que já existem e terminar os projectos que já foram iniciados, e então depois avançar em diálogo com os proprietários. Os proprietários como não podem construir nessas zonas, por vezes têm uma atitude um pouco de repulsa em relação à colocação de pinheiros, pois dizem «que se não podem construir, também não se faz mais nada», e isto é um processo também de mudança de mentalidades das pessoas, por forma a que percebam que pelo facto de não poderem construir nos terrenos não possam ter outra utilidade, e essa utilidade passando pelo aumento do coberto vegetal, seria importante para o Porto Santo.”.*

As medidas apresentadas pelo PSDPS, para atenuar o processo de desertificação vão de encontro à reflorestação, como se depreende das suas palavras: *“Eu julgo que a principal medida, é naturalmente a reflorestação da Ilha, isso já tem vindo a ser feito pelo Governo Regional, nos últimos 20 ou 30 anos, pelo menos nas zonas do Pico de Ana Ferreira e no sítio dos Morenos, e acho que com bons resultados. Essa plantação ... poderá ser feita noutros locais, e ... existem mais alguns aspectos que poderão melhorar, nomeadamente a questão do campo de golfe, que penso de alguma forma, talvez menos drástica, também pode contribuir para esse atenuar da desertificação. E ainda, a construção de algumas barragens ... que também são fundamentais, para estancar o fluxo da água, e portanto, toda aquela torrente que se vê com frequência quando há chuvadas fortes.”.* (PSDPS).

Como já referido acima, uma boa gestão dos sistemas de rega em zonas florestadas e a florestar é muito importante, quando questionado sobre a possibilidade da intervenção da Sociedade de Desenvolvimento de Porto Santo na prestação destes serviços, o PSDPS respondeu o seguinte: *“ (...) relativamente à questão da possibilidade da SDPS poder ter algum tipo de intervenção nesta matéria, nós neste momento suprimos as necessidades de rega do campo de golfe, com duas fontes de fornecimento de água, uma da Ilha, nomeadamente através da reciclagem da água, na ETAR da Ponta, e com outra que é as águas das chuvas. Felizmente, a componente da água das chuvas tem sido cada vez maior*

nestes últimos anos. No futuro dado que o complexo do campo de golfe... vai ter um desenvolvimento muito maior,... e dado que da parte do IGA (Investimentos e Gestão de Água, S.A.), não me parece haver capacidade para no futuro fornecer os caudais ... previstos para todo aquele complexo, nós estamos a estudar a possibilidade de fazer a aquisição de uma dessalinizadora própria para água de rega, ... que possa suprir as necessidades do campo de golfe, ... e poderemos eventualmente no futuro, poder dispensar alguma água excedentária que venhamos a produzir e que venha a ser possível. Mas, não pretendemos neste momento assumir, nem qualquer protagonismo, nem qualquer compromisso nessa matéria. O que não significa que, havendo meios técnicos no futuro, se essa oportunidade existir, não se possa vir a estudar esse assunto.”.

No que concerne à medidas necessárias para atenuar o processo de degradação e desertificação o EA, referiu essencialmente ações ligadas à recuperação/conservação do coberto vegetal bem como as medidas de reflorestação que têm vindo a ser feitas ao longo do tempo, como se depreende das suas palavras: *“Eu julgo que se pode dizer, independentemente da crítica que se possa fazer às espécies escolhidas para se fazer a rearborização dos picos e das zonas mais declivosas de Porto Santo, há que louvar as iniciativas desde longa data no sentido de se fazerem plantações de espécies arbóreas e arbustivas para combater essa desertificação, que por sua vez arrasta fenómenos de erosão, e portanto foi feito já muita coisa. E agora,... há que continuar um trabalho que nunca chegou a ser completado, o qual se intensificou mais, sobretudo a partir de 55, foi na altura que vieram para cá os serviços florestais, há agora que completar esse trabalho e sobretudo fazer um uso mais significativo das espécies que eram e são características de Porto Santo. Porque, pese embora o Pinheiro do Alepo ser uma espécie já muito bem aclimatada no Porto Santo, isso não significa que se use exclusivamente esta espécie nas rearborizações que estão a ser feitas, porque qualquer fenómeno ou enfermidade, seja de origem criminosa ou até de origem natural, uma faísca de um raio qualquer, por exemplo, se um dia chegar a uma zona seja do Pico Castelo ou do Ana Ferreira, que já está também com uma rearborização bastante interessante, aquilo vai desaparecer tudo num instante. Por isso há que fazer, não só compartimentações, nesse processo de rearborização, como também utilizar, muitas vezes, não uma árvore, mas um arbusto. O Porto Santo tem ainda muitos arbustos, como o espinheiro, o massaroco, a urze, são espécies que podem existir em comunhão com outras espécies e, portanto usar todo esse armamento que a flora indígena ou endémica de Porto Santo, nos proporciona e, fazer com que ela fique mais representada em todos os processos, contra a desertificação que há que entender agora com mais significado.”.*

O MF referiu que as medidas que têm sido tomadas e a tomar por parte do Governo Regional, são as seguintes: *“ (...) a arborização, a retirada do gado, trabalhos da*

correção torrencial através da construção de pequenas barragens nos locais mais sensíveis, ou seja nos locais onde se nota, que quando caem as chuvas, estas rasgam o terreno (ribeiras). E em princípio, nos próximos 4 anos, o governo irá avançar com um novo projecto, que implica, a construção de mais barragens, a diversificação de espécies como combate à monocultura, dentro das quais as que se adaptem ao Porto Santo, nomeadamente que se adaptem ao clima árido de Porto Santo.”

d) Caracterização do coberto vegetal

O SRARN faz a seguinte caracterização do coberto vegetal da Ilha: *“O coberto vegetal de Porto Santo, é digamos filho único, digamos tem que ser tratado «ao colo», porque as suas condições naturais não são muito propícias à sua manutenção e desenvolvimento, e portanto depende muito da iniciativa dos serviços e das entidades públicas e privadas e das condições naturais.”*

Referiu ainda alguns aspectos relativamente ao elevado número de pinheiros que morreram durante o ano de 2004/2005, principalmente no Pico do Castelo, onde foram deixadas muitas clareiras, em que atribui à seca a causa da morte dos pinheiros, tendo referido o seguinte: *“Este ano temos tido alguns problemas, tivemos o pior ano desde que há registos em matéria de pluviosidade e registos desde há 60 anos, e isso fez com que algumas espécies secassem, ... temos já aprovados alguns projectos com apoios comunitários, e não só vamos repor o que existia como vamos ainda acrescentar outras áreas.”* (SRARN).

Continuou a descrever o coberto vegetal de Porto Santo: *“(…) o coberto vegetal ... de Porto Santo dependerá sempre do empenho das instituições e como ... existem condições propícias, quer porque é essa a nossa motivação, quer porque a população em geral e a opinião pública está cada vez mais sensível para esses valores, ... no futuro não vai ser pior do que tem sido até aqui. Pelo contrario, até pelo desenvolvimento alcançado, as pessoas já estão mais propensas a que se gaste dinheiro público nessas áreas, não só aceita como estimula que haja empenho público nessas matérias, é tão importante ter um bom coberto vegetal como ter água e luz, ... e portanto, no fundo as condições de desenvolvimento que conseguimos tanto na Madeira como no Porto Santo, penso que vão estimular que esse trabalho continue e que seja até melhorado.”* (SRARN).

Relativamente à evolução do coberto vegetal o DRF abordou o seguinte: *“É uma evolução muito positiva. Hoje é já possível identificar uma extensa mancha florestal na Ilha que cobre mais de 10 % da sua área total e que retribui o verde ao Porto Santo. Estão também criadas as condições para a expansão (dentro da medida do possível) do coberto florestal indígena de Porto Santo.”*

Quanto à classificação actual do coberto vegetal, referiu: *“É um coberto essencialmente constituído por espécies exóticas, mas que cumprem as “funções” da sua instalação. Há alguns anos ... tem existido um esforço para diversificação das espécies utilizadas nos diversos projectos de florestação, utilizando-se inclusive algumas espécies indígenas de Porto Santo com o intuito de aumentar a biodiversidade.”* (DRF).

Considerando a baixa biodiversidade nas zonas florestadas, tentou-se compreender a razão da escolha das espécies florestais que existem actualmente na Ilha, ao que o DRF respondeu: *“As espécies predominantes actualmente na Ilha são espécies que se adaptam muito bem às condições inóspitas e agrestes verificadas nas zonas arborizadas. O coberto florestal existente actualmente na Ilha foi fruto de instalações efectuadas há décadas que tiveram ... um forte acompanhamento e manutenção dessas mesmas instalações. Contudo, a DRF tem vindo progressivamente a introduzir nos povoamentos puros existentes outras espécies diversificando assim estes mesmos povoamentos. Esta diversificação acontece em alguns casos só agora, porque só agora é que se encontram reunidas as condições edafoclimáticas para que essa introdução possa acontecer. Contudo, podemos dizer que o caminho é o da biodiversidade e da instalação de outras espécies, sempre que exista a garantia que essas espécies adaptar-se-ão ao Porto Santo, não esquecendo as condições «especiais» existentes no Porto Santo.”* (DRF).

No que concerne à classificação do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo, o DJBM refere o seguinte: *“A maior parte do coberto vegetal de Porto Santo é herbáceo, e algum arbustivo e arbóreo, em quantidade reduzida. A maior parte do coberto arbóreo é exótico, é dominado pelo *Cupressus macrocarpa* e *Pinus halepensis*, enquanto que nas escarpas de Porto Santo, nas zonas de alguns picos encontramos aí o resto da vegetação e flora primitiva de Porto Santo, onde existem plantas que estão extremamente adaptadas a essas condições, plantas que são rupícolas e outras que não o são e conseguimos encontrar alguns núcleos de oliveiras bravas, de marmulanos, e outros tipos de espécies. Por exemplo, no Pico Branco encontra-se uma vegetação arbustiva bem conservada e recuperada, só que estão em áreas inacessíveis, em que mesmo nós nunca lá chegamos. Mas existem garantidamente uma grande quantidade de arbustos, como o massaroco, o *Hypericum glandulosum*, *Helichrysum melaleucum*, a *Artemisia argentea*, ou seja uma diversidade de plantas e ainda outras, é duma exuberância que nem sequer parece que estamos no Porto Santo. Se nós formos para as zonas mais baixas, aí a vegetação natural quase não existe. Existe uma grande quantidade de plantas herbáceas, muitas delas anuais, mas mesmo assim, nas zonas mais baixas, encontram-se algumas espécies endémicas de Porto Santo como é o caso do *Lotus loweanus*, e muitas outras, e são essas essencialmente que estão em grande perigo, porque estão nas zonas onde estão a ser construídas habitações, campo de golfe, etc. Classifico o coberto vegetal em relação ao coberto arbóreo pouco diversificado e pouco*

abundante, mas mesmo assim existe uma certa diversidade de espécies indígenas e endémicas de Porto Santo.” (DJBM).

No que se refere ao facto de actualmente a Ilha de Porto Santo sofrer de um problema de monocultura, devido à baixa diversidade de espécies vegetais nas zonas florestadas, e a razão da escolha das espécies exóticas existente, o DJBM referiu o seguinte: *“... um dos principais factores foi o desconhecimento do que era indígena de Porto Santo, e a utilização de espécies exóticas das quais já conheciam o comportamento e também que conseguiam ter grande quantidade de material para introduzir no terreno. É que em relação às espécies que são indígenas de Porto Santo, a propagação destas espécies torna-se difícil porque não existe nem material vegetal nem sementes para propagar. Penso que foram estes dois os principais factores. ... Contudo, fico satisfeito, porque as autoridades que têm responsabilidade no processo de arborização e de reflorestação no Porto Santo, estão sensibilizadas para estes aspectos de conservação que devem ser realizadas com espécies indígenas adaptadas ao local. Claro que existem sempre factores limitantes, que é a obtenção de material, a dificuldade em obter estas plantas. E daí talvez a necessidade de introduzir alguma espécie exótica, desde que não tenha carácter invasor e tenha o carácter de servir de pioneira, claro que, existem certamente espécies indígenas que têm esse carácter pioneiro, mas de qualquer maneira no Porto Santo, existe tão pouca quantidade de solo que para introduzir árvores, torna-se extremamente difícil, podíamos iniciar,... com arbustos e plantas herbáceas, mas para a maior parte da população quando falamos em reflorestação, pensam logo em árvores e nos nossos tempos de vida, querem ter resultados logo imediatos.”.*

O PCMPs fez a seguinte avaliação da evolução do coberto vegetal e da situação actual: *“(...) neste momento penso que a evolução tem sido gradual, embora eu penso que não foi cumprida a programação inicial que havia por parte da DRF, mas temos o problema acrescido dos coelhos que atacaram muitas árvores, matando-as. Comparado com há 20 ou 30 anos, existem mais árvores hoje, e o coberto vegetal é muito maior hoje, mas de qualquer maneira, penso que seria importante continuar este esforço, para pelo menos se cumprir o programa inicial previsto e que foi interrompido por um conjunto de factores.”.*

A avaliação da evolução do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo pelo PSDPS, é a seguinte: *“(...) nos últimos 45 anos, a Ilha tem tido sempre alguma dificuldade em fixar as espécies vegetais que se plantam. Tem havido com alguma frequência, algumas plantações que não têm corrido bem porque a Ilha atravessou períodos de grande seca. Actualmente, ... chove mais na Ilha de Porto Santo, pelo menos da experiência que temos tido nestes últimos anos, e ... o sucesso das plantações que foram feitas no Pico de Ana Ferreira e no sítio dos Morenos, mostram que se pode fazer isso noutros locais. São processos muito longos, o processo dos Morenos, ... tem cerca de 20 a 30 anos, mas se não começarmos hoje também daqui a 30 anos nada teremos. Portanto, julgo que se deve insistir e continuar a promover essa*

reflorestação. *Eu acho que relativamente aquilo que se fez, a avaliação é positiva, e ... é uma experiência que se deveria repetir noutras áreas.*”

Considerando o aspecto da monocultura com resinosas, o EA referiu algumas das razões que na sua perspectiva estão relacionadas com a escolha das espécies florestais que existem actualmente na Ilha: *“Quem deve ter introduzido o Pinheiro do Alepo no Porto Santo, nem deve ter sido a pessoa que é referida como talvez o devesse ter feito, que é o caso do Regente Florestal Schiappa de Azevedo, que creio que entre 1912/13 e 1920 (foi um homem extraordinário, cheio de dinamismo e força de vontade), mandou vir sementes do Alepo de várias partes, inclusive no continente e mandou-as semear em diversos pontos da Ilha de Porto Santo. ... De qualquer maneira fosse quem fosse o introdutor do Pinheiro do Alepo na Ilha, deve tê-lo feito mais como curiosidade e talvez justamente como planta para decorar um jardim, ou para compor mais uma determinada mancha. Razões para isso: a conhecida adaptabilidade do Pinheiro do Alepo às condições de secura da sua região de origem, onde ele existe, ele é um pinheiro característico de zonas rochosas e secas, Invernos pouco chuvosos, verões muito quentes. Portanto, tinha umas características em perspectiva de boa adaptação às condições de Porto Santo e essa deve ter sido, quanto a mim, além de ter um crescimento razoável comparado com o dos dragoeiros, ou dos zimbreiros, das oliveiras bravas ou dos barbusanos, ... entretanto a razão deve ter sido essa. O Cupressus macrocarpa, do ponto de vista de solo, é uma espécie americana de regiões marítimas, e portanto tem também características de adaptabilidade a solo pedregoso, condições próximas das mediterrânicas, no seu habitat natural, e também era uma espécie que oferecia bons crescimentos, e aliás prova-se pelos exemplares que ainda existem quer no Pico do Castelo quer nas zonas mais baixas de Porto Santo. Foram duas espécies utilizadas, essencialmente pela rapidez de crescimento, pelo coberto que proporcionavam de certa forma também com alguma beleza, tudo isso levou a que se fosse para estas espécies, porque na altura, começando já no tempo do Schiappa, 1912, o que existia no Porto Santo de vegetação era muito escasso, o Pico do Castelo era um pico praticamente nu, de forma que começou essencialmente a partir dessa data a verdadeira cobertura vegetal, uma coisa ritmada e com um certo planeamento, foi-se para essas espécies.”*

Actualmente o coberto vegetal da Ilha é: *“... artificial, ainda muito incompleto, embora o existente tenha como justificação, justamente, para atenuar os processos de erosão que estavam em curso, que são essencialmente provocadas pela chuva, mas também pelo vento e, portanto o próprio processo de plantação em zonas declivosas de qualquer dos picos de Porto Santo, e em zonas arenosas para evitar também a erosão das areias...”* (EA).

Acrescentou ainda, relativamente ao futuro da reflorestação da Ilha: *“(...) Parece-me que seja de facto a altura para repensar todo o processo de revestimento florestal de Porto Santo, e de irmos para uma arborização mais significativa de espécies características de Porto Santo. O que é preciso é que se estabeleçam viveiros com as espécies, até porque a existência aqui de espécies de dragoeiros e de zimbreiros, não é ainda uma coisa muito*

significativa, é mais significativa nos quintais das residências do que propriamente nas zonas montanhosas e portanto há que fazer esse trabalho. Eu queria acrescentar que também aqui nestes dois aspectos, a influência dos animais, visto que o coelho ainda existe, é também de considerar, porque muitas vezes, o dragoeiro sobretudo se for para uma plantação de exemplares muito pequenos, o coelho vai destruí-los ... Mas sobretudo tentar a maior diversificação, mesmo talvez com a utilização de uma ou outra espécie exótica que no Porto Santo se possa adaptar, mas obviamente com a predominância grande das espécies indígenas.” (EA).

No que concerne à evolução do coberto vegetal da Ilha o MF, referiu o seguinte: “ (...) quando se iniciou a arborização no Porto Santo, optou-se por utilizar o pinheiro – *Pinus halepensis*, que é uma espécie que era muito resistente, mas ao longo dos tempos verificou-se que essa não era a melhor opção, havia a necessidade de diversificar. E portanto, em 1990, com a colaboração de uma empresa dinamarquesa, deslocaram-se técnicos ao Porto Santo para fazer o estudo e tentaram introduzir outras espécies. Das centenas de espécies que experimentaram em Porto Santo, apenas cerca de 40 se adaptaram a Porto Santo.” Quanto à avaliação que faz da evolução do coberto vegetal refere: “Mais abundante e mais diversificado. Entre a década de 70 a 80, praticamente só se florestava com *Pinus halepensis*. A partir da década de 90, tentamos diversificar. ... Por exemplo, é possível verificar que no Pico do Castelo deste o topo até mais ou menos a meio do Pico existe uma floresta mais diversificada, existindo desde a azinheira até sobreiros, a oliveira, o *Cupressus*, o *Pinus halepensis*. ... De meio para baixo, a diversidade é menor, estamos a falar de dois períodos de reflorestação diferentes, em que o primeiro, do topo até meio, foi da responsabilidade de Shiappa de Azevedo, embora não toda, existem partes que já foram florestadas depois disso, e de meio até baixo, foi uma 2ª fase, da responsabilidade do Eng.º Campos de Andrada.” (MF).

Refere ainda, quanto à situação actual e perspectivas de futuro: “As características da Ilha, e desde os tempos de então, o Porto Santo nunca foi muito reflorestado. E a nível paisagístico há locais que são intocáveis, mas nas zonas que estão mais sujeitas à erosão convém ampliar mais o coberto vegetal. Há zonas que não se justifica, mexer no terreno ou alterar a paisagem porque, de cada vez que se toca num lugar para arborizar, no Porto Santo, altera por completo essa zona. Uma dessas zonas é por exemplo, o Pico Branco, embora exista um viveiro. O Pico de Ana Ferreira, por exemplo tem zonas erodidas, e aí há que combater a erosão com árvores de meio porte ou arbustos. Há paisagens, ou zonas que se fossem preservados os muros que existiam, desde então, talvez ficasse mais bonito do que estar a plantar árvores. Estes tinham a função de travar a erosão, e uma vez que já não existe o gado, iriam permitir também que se desenvolvessem outras plantas naturais daquele meio. Para travar a erosão funcionam melhor as ervas e os arbustos do que as árvores de grande porte.” (MF).

e) Utilização de novas metodologias (e.g. micropropagação de plantas) para minimização do processo de desertificação

No âmbito desta dissertação, recorreu-se à utilização da biotecnologia através de micropropagação para estabelecer in vitro plantas de oliveira brava, e num estágio final da micropropagação fazer a introdução destas plantas micropropagadas no campo no âmbito de programas de reflorestação em curso. No sentido de compreender qual a percepção e aceitação dos entrevistados relativamente à aplicação de novas metodologias no âmbito dos processos de reflorestação da Ilha, questionou-se sobre a sua opinião e concordância quanto a este assunto. No geral, todos os entrevistados concordaram com a aplicação destas novas metodologias para ajudar os programas de reflorestação, contudo, apresentaram alguns pontos de vista distintos.

O SRARN, referiu o seguinte: “ (...) quando me pergunta se concordo com a aplicação de novas metodologias, o que posso dizer é que não só concordo como estímulo. ... Felizmente na Madeira com a natureza que temos, grande parte do trabalho é feito pela “própria natureza”, mas quando existe a intervenção humana, a utilização de novas tecnologias e dos equipamentos e infraestruturas, nomeadamente ter um laboratório de micropropagação, deve ser utilizada. Portanto, acho que está a cumprir o seu dever de utilizar todas as tecnologias e equipamentos, ... para o serviço do seu objectivo que considero nobre.”

O DRF apresentou um outro ponto de vista, relativamente à aplicação de novas metodologias nos processos de reflorestação: “(...) novas tecnologias, que muitas vezes são demasiado caras demorando naturalmente algum tempo a dar os seus «frutos». O que acontece por vezes, é a necessidade de aproveitar os programas e fundos existentes para a florestação de Porto Santo, existindo muitas vezes um timing apertado para a sua realização. Contudo, achamos que se poderá utilizar estas novas tecnologias para obtenção de material com fins de ser utilizado nos projectos de reflorestação de Porto Santo, desde que, forneçam plantas em quantidade e qualidade e nos timings adequados para que se possa realizar com sucesso os projectos preconizados.”. Referiu ainda, quanto à escolha da oliveira brava, como planta a micropropagar, que: “Sem dúvida que a *Olea maderensis* é uma espécie importantíssima nos projectos de reflorestação de Porto Santo, por ser tratar de uma espécie indígena.” (DRF).

Na abordagem feita pelo DJBM, este mostrou concordância, no entanto salientou algumas preocupações relativamente à utilização de novas metodologias: “Desde que seja assegurado que a quantidade de mutações seja mínima, sou a favor, por exemplo, em

relação ao adorno existem poucos exemplares, o Juniperus turbinata, idem, portanto havendo primeiro uma fase de propagação vegetativa, por essas técnicas, desde que a planta não sofra muitas mutações que ponham em perigo depois, a própria sobrevivência ou até a produção de sementes por um processo normal, acho que sim. Estou de acordo com a aplicação de novas tecnologias, mas nunca existir uma monocultura dessas espécies que são tudo clones do mesmo indivíduo. Estou de acordo nos casos em que haja poucos indivíduos na natureza, propagar vegetativamente esses indivíduos para que depois consigam produzir sementes e para depois haver regeneração das próprias populações. ... Isto porque eu julgo que todo o processo de reflorestação deve ser feito com origem seminal, portanto para haver uma maior diversidade/variabilidade genética. Também estou de acordo que haja propagação vegetativa através dessas técnicas para propagar espécies que tenham grandes potencialidades económicas, mas aí já não é numa perspectiva de conservação, mas para um processo de produção, por exemplo, quando se encontram indivíduos que têm uma grande capacidade de produção de madeira.”

Tanto o PCMPS como PSDPS concordaram integralmente com a utilização de novas metodologias para ajudar a reflorestação da Ilha. Assim o PCMPS referiu o seguinte: *“Eu acho que tem que se aproveitar tudo o que a ciência nos disponibiliza, se há hipótese eu acho que sim, que faz todo o sentido e o homem tem que se adaptar às realidades e às descobertas que se vão fazendo e acho perfeitamente normal que isso aconteça, concordo 100%.”*

E o PSDPS respondeu: *“Eu concordo não só na investigação e no desenvolvimento de plantas que permitam uma propagação maior e mais rápida, como no desenvolvimento ... de espécies que possam ser mais resistentes às condições adversas que temos na Ilha ... e se simultaneamente também se conseguir que elas sejam de crescimento mais rápido (...)”*,

Relativamente a esta temática o EA expõe o seguinte: *“Eu acho que sim, tem é que depois que se medir o custeamento de um processo desses relativamente a um processo que se afigura igualmente pratico e eficiente mas que seja economicamente mais barato. Agora nos sítios onde para algumas espécies, é muito difícil outro tipo de propagação, como é o caso dos seus trabalhos, quer relativamente à oliveira, quer o próprio Juniperus, que não são árvores de propagação muito fácil, pelo menos no caso da Madeira, julgo que se deve utilizar tudo o que seja, o artificialismo que o conhecimento científico nos vai dando a conhecer, e que deve ser aplicado.*

Quanto à utilização da oliveira brava nestes estudos de propagação referiu que: *“(...) esta é uma espécie indígena, ... é uma espécie com o seu interesse, não é uma espécie de grande porte, mas é uma folhosa, com um grande interesse nos processos fisiológicos da própria vegetação é uma espécie altamente resistente à seca e às condições de solo de Porto Santo. Portanto tem todas as condições para vir a ser uma planta que complemente e complete*

qualquer processo de rearborização no Porto Santo, sobretudo na zona mais oriental de Porto Santo, onde a oliveira brava era e parece-me que ainda é mais frequente, seria interessante que se intensificasse a sua plantação e depois a sua propagação.”. Relativamente a esta ser uma boa espécie arbórea para combater os processos erosivos, referiu ainda: “...é uma belíssima espécie, rebenta facilmente de toixa, portanto cria grande volume de vegetação ao nível do solo e ... tem todas as condições para ser um obstáculo de primeira grandeza quanto à evolução dos processos erosivos.” (EA).

O MF mostrou igualmente a sua concordância: *“Todas as técnicas para melhorar são sempre bem vindas, contribui muito. Uma vez que, existe mesmo muita dificuldade em propagar pelos processos normais, mesmo ao nível de estacas, há muita dificuldade. Já se tentou fazer, aqui nos nossos viveiros, estacaria da oliveira brava e não se conseguiu nada. A Olea europaea, ainda tivemos algumas estacas que rebentaram, mas não estão com muito bom aspecto.”* E ainda, no concerne à escolha da oliveira brava, refere: *“Sim concordo, pois esta é uma espécie que se adaptará mais às condições climáticas de Porto Santo, é uma espécie mais resistente, como comprovam as que ainda existem, que não levaram nenhum tratamento especial e continuam lá. É mesmo uma boa espécie como combate aos processos erosivos.”.*

III.4 Discussão

III.4.1 Percepção face à desertificação

A desertificação é um processo global com consequências locais graves, e diz respeito a todos. Alguns porque activamente ou passivamente causam ou agravam o processo, e outros porque directa ou indirectamente, sofrem as consequências (Anon. 1999). Neste sentido, Oñate and Peco (2005) referem que só perante a integração das percepções das populações, relativamente à compreensão que fazem dos cenários regionais e locais dentro dos quais as decisões individuais são feitas, é que será possível o desenvolvimento de políticas e estratégias fiáveis de combate à desertificação.

Entre a população inquirida, residente em Porto Santo e visitante da Ilha, existe um grande reconhecimento do termo “desertificação”, embora com maior percentagem por parte dos visitantes do que dos residentes (86% contra 74%, respectivamente), o que se poderá depreender, ser devido ao nível de escolarização mais elevado dos visitantes. No que respeita ao conceito de desertificação/degradação dos solos, este é geralmente, interpretado, como algo que está relacionado com solos desflorestados ou com vegetação escassa e solos empobrecidos/desqualificados/degradados ou erosionados, havendo um consenso quanto a esta interpretação por parte dos residentes e visitantes. No entanto, poucas são as pessoas que conseguem dar uma definição aproximada da definição da UNCCD, sendo a maioria das respostas, apesar de minimamente esclarecedoras, muito redutoras, em que se verifica ainda que, muitas vezes, existe alguma confusão entre o conceito e as causas. Um resultado idêntico foi encontrado num estudo de Oñate and Peco (2005), o qual verificou nos respondentes uma mistura entre conceitos e causas do termo desertificação, e justifica que isso poderá ser reflexo da ambiguidade do sentido amplo implícito na definição do termo pela UNCCD.

No que se refere às causas atribuídas à desertificação, a maior percentagem de resposta tanto dos residentes como dos visitantes vai tanto para causas naturais como humanas, contudo existe ainda uma percentagem considerável de residentes (20%) que atribui apenas a causas humanas. Ao especificarem as causas responsáveis pelo processo de degradação do solo/desertificação, os residentes apontam como principal causa a seca ou também mencionada aridez e as más práticas humanas, enquanto que os visitantes apontam em primeiro lugar as catástrofes naturais ou alterações climáticas e também a desflorestação. De acordo com Figueiredo (2003), esta

diferença nas respostas poderá ser explicada, através do peso da relação diferenciada que cada um dos tipos de inquiridos (residentes e visitantes) estabelece com o território.

As principais consequências do processo de desertificação identificadas foram o empobrecimento do solo, a alteração das condições hidrológicas de superfície devido à perda de coberto vegetal, a degradação das populações animais e vegetais e a degradação do solo e a erosão. As diferenças nas respostas, dos dois tipos de inquiridos, vão para consequências, que não tendo sido mencionadas com tanta frequência como as anteriores, apresentam alguma representatividade, nomeadamente 17% dos residentes consideram que uma das consequências da desertificação está relacionada com o abandono da agricultura, enquanto que 21% dos visitantes refere o despovoamento.

Quanto à aquisição do conhecimento sobre a problemática da desertificação, tanto residentes como visitantes dizem ser proveniente dos “meios de comunicação”. Contudo, é fundamental, tal como referem Neves et al. (2008), que se entenda, que uma boa compreensão do fenómeno permite a implementação de medidas e acções de combate e mitigação, e de que para tal é essencial que a sociedade seja informada de uma forma correcta sobre a gravidade que constitui a desertificação, nomeadamente pelos meios de comunicação disponíveis. Existe também um grande número de residentes que refere que o conhecimento provém do “contacto directo com a Ilha de Porto Santo”, enquanto os visitantes referem ser também proveniente de “conversas com familiares e amigos”. No entanto, pode depreender-se, que os residentes, ao dizerem ser do contacto directo com a Ilha, concordam que, de facto, a Ilha esteja desertificada. É interessante também verificar que, ainda assim, 16% dos visitantes também afirmam que o conhecimento provém do contacto directo com a Ilha.

III.4.2 Percepção face à desertificação na Ilha de Porto Santo (causas, consequências, medidas)

O fenómeno de desertificação que tem fustigado a Ilha de Porto Santo ao longo dos tempos é reconhecido por grande parte da população residente (78%), bem como pelos visitantes, embora com menor percentagem de visitantes (66%). Também as entidades e os especialistas entrevistados reconhecem o problema na Ilha, atribuindo o fenómeno a diversos factores, nomeadamente: o facto da Ilha ser de dimensão

pequena e como tal torna-a num ecossistema extremamente frágil, e ainda a destruição do coberto vegetal e os processos erosivos.

As causas do processo de desertificação na Ilha, são atribuídas por ambos os tipos de inquiridos (residentes e visitantes), tanto a causas humanas como naturais. Contudo, constatou-se que uma percentagem considerável de residentes atribui a desertificação à influência humana. Apesar de ter havido uma baixa percentagem tanto de residentes como visitantes na especificação das causas responsáveis pelo processo de degradação do solo/desertificação na Ilha, constatou-se que ambos os tipos de inquiridos, atribuem o problema de desertificação na Ilha, principalmente à seca/falta de chuva. Os residentes atribuem ainda às más práticas humanas e ao abandono da agricultura. Franco (1994) descreve em relação à superfície agrícola cultivada na Ilha de Porto Santo, que em 1977 esta era de cerca de 780 ha, à qual corresponde agora uma área igual de solos outrora cultivados e agora abandonados. A este nível, o EA, defende que algumas áreas da Ilha deveriam ser reservadas para a agricultura, considerando as óptimas condições que a Ilha apresenta, como refere: *“Faz-me pena que se esteja a perder a pouco e pouco as óptimas condições que o Porto Santo tinha para a uma agricultura de qualidade. Não podemos pensar no mesmo tipo de agricultura que se pensava há uma centena de anos ...tem que ser uma agricultura mais evoluída ...menos contingente,... a terra que existe nesta Ilha e o seu clima e as condições que proporcionam a produção agrícola, têm que ser devidamente valorizados e rendibilizados. E há uma reserva de terrenos quer ecológica, quer agrícola que convinha aplicar e definir aqui para o Porto Santo (...).”*

Os visitantes atribuem, ainda, como causa de degradação dos solos a construção sem planeamento, o que poderá estar relacionado com a percepção que têm da Ilha durante a sua estadia. Ainda, na visão do EA, é incluído um outro factor causador da destruição da vegetação e indirectamente da degradação dos solos: *“(...) o Porto Santo teve um inimigo feroz em conjunto com o homem que foram os coelhos e todo gado, que foi criado ao ar livre para o sustento das primeiras populações que viveram no Porto Santo. Até porque para os exemplares jovens que se produziam naturalmente na Ilha, como pequenos dragoeiros, pequenos zimbriros, pequenos marmulanos, etc. essencialmente o coelho e a cabra, foram elementos destruidores de grande importância.”* (pg. 226).

Segundo a opinião das entidades e especialistas entrevistados, é consensual que a destruição do coberto vegetal foi uma das principais causas responsáveis pelo processo de desertificação na Ilha de Porto Santo. Contudo o DJBM apresenta, ainda, uma causa que poderá estar na origem da baixa precipitação existente, o que consequentemente interfere com o coberto vegetal: *“O Porto Santo como também é uma Ilha relativamente baixa, recebe, ou pelo menos não é captado com grande abundância como é na Ilha da Madeira, a água que vem nos nevoeiros que é trazido pelos ventos alísios, é por isso*

que também é uma Ilha que certamente nunca teve grande abundância de água, é por isso que qualquer intervenção ao nível do coberto vegetal faz um grande efeito, ou seja faz sentir algum desequilíbrio na Ilha o que provoca um conjunto interligado de rede de factores,.... que leva logo à destruição.” (pg. 225).

No que concerne à opinião dos residentes e visitantes, relativamente ao modo como a desertificação tem afectado a Ilha, a resposta é homogénea ao responderem que tem afectado essencialmente a vegetação, tornando-a cada vez mais escassa, aumenta a degradação dos solos, e leva a um agravamento da erosão. Mais uma vez os residentes salientam o abandono das actividades agrícolas. Saliente-se que na visão de uma parte dos residentes, quando foi pedido para estabelecer uma relação entre o abandono da agricultura com o processo de degradação dos solos, dos 60% inquiridos que concordaram com a existência de uma relação, 20% atribuíram as seguintes razões: *“A actividade agrícola evita a degradação do solo (o abandono da agricultura torna o solo mais exposto aos factores erosivos)”* e ainda *“O abandono da agricultura e a destruição dos socalcos levou ao desleixo e a falta de preservação”*, ou seja, segundo estes residentes, a actividade agrícola era vista como vantajosa no que se refere à conservação dos solos. Apenas uma baixa percentagem de residentes referiu que a actividade agrícola levou ao empobrecimento dos solos.

Para a minimização e mitigação das consequências do processo de desertificação os dois tipos de inquiridos (residentes e visitantes) sugeriram maioritariamente a recuperação e conservação do coberto vegetal e mais repovoamento florestal. Contudo, os visitantes colocam como prioridade, relativamente aos residentes, a aplicação de políticas de ordenamento do território e só depois indicam a necessidade de uma boa gestão das águas de escorrência, onde se inclui a existência de novos sistemas de captação e armazenamento de água (tendo sido esta a segunda medida apontada pelos residentes). Referem, ainda, a necessidade de protecção da paisagem. Perante isto torna-se obvio que todas as medidas que forem tomadas terão melhores resultados se houver a sensibilização das pessoas, medida esta também muito assinalada.

Ao nível das medidas de prevenção/combate aos problemas de desertificação, apenas menos de metade da população residente considera que já foram tomadas medidas, tendo sido atribuída a responsabilidade pela tomada dessas medidas, maioritariamente à Direcção Regional de Florestas. Quanto às medidas que consideram que têm sido tomadas, apontaram com maior representatividade o repovoamento florestal de algumas zonas da Ilha e campanhas de sensibilização da população e ainda alguns referem a gestão de águas de escorrência.

Relativamente a este aspecto a opinião das entidades entrevistadas é em parte consensual com a opinião da população, no que concerne às áreas florestadas, como se depreende do que diz o SRARN: “ (...) fizeram-se alguns projectos, já com dezenas de anos, nomeadamente de florestação e que têm dado bons resultados, penso que hoje é marcante a diferença nalgumas áreas de Porto Santo, mas que precisam de ser continuados, aliás temos já aprovados projectos para continuar os trabalhos de reflorestação.” (pg. 227). Verifica-se ainda, que o SRARN revela também medidas a serem tomadas futuramente através da continuidade de projectos de reflorestação.

O DRF refere, para além das medidas que têm vindo a ser tomadas da sua tutela: “ (...) o constante acompanhamento e os trabalhos contínuos de manutenção que têm que ser realizados em áreas que já foram florestadas, trabalhos estes que têm vindo a ser realizados ao longo de várias décadas.”. Referiu também, a continuidade de projectos que se relacionam com a atenuação das consequências do processo de desertificação, que vão no sentido de: “Atenuar as zonas mais degradadas ao nível do solo através da instalação de espécies exóticas pioneiras que permitam criar condições para o melhoramento do solo... infra-estruturas que permitam ... a instalação de pontos de água, a abertura de caminho florestais ... correcção torrencial nas linhas de água mais erosionadas. E, por outro lado recuperar a vegetação indígena de Porto Santo... através de trabalhos de reprodução e introdução de espécies indígenas e endémicas da flora de Porto Santo.”. E acrescenta ainda que: “ (...) as prioridades de florestação prendem-se essencialmente com zonas em que os processos erosivos são preocupantes e onde não existe nenhum tipo de vegetação, como é o caso do Pico do Concelho.” (pg. 228).

O DJBM referiu ainda o papel importante que o Jardim Botânico desempenha na Ilha de Porto Santo, como apoio a todo o trabalho desenvolvido pela DRF, nomeadamente: “(...) o conhecimento e o estudo das espécies que existem no Porto Santo, quer as espécies que foram introduzidas quer principalmente as espécies indígenas e dentro das indígenas as endémicas. Fazer uma monitorização, ou seja, anualmente ou em determinados intervalos de tempo, saber o que está acontecendo com algumas populações de espécies mais raras, verificar se a área está a aumentar ou a diminuir. ... Temos um trabalho que é feito todos os anos de recolha de sementes das espécies endémicas e das indígenas de Porto Santo e também do estudo que foi realizado à pouco tempo sobre as associações, sobre a vegetação de Porto Santo.” (pg. 229).

As entidades locais, nomeadamente o PCMPS e o PSDPS, atribuem a responsabilidade da tomada de medidas para a prevenção/combate ao processo de degradação do solo/desertificação ao Governo Regional da Madeira, mais precisamente através da Direcção Regional de Florestas.

Segundo Fordham (2000), citado por Coelho et al. (2004), é destacada a importância do ‘desenho da comunidade participada’, integrando o contributo e o

conhecimento local da população e a experiência dos técnicos. Neste sentido, é muito importante a informação, a sensibilização e o envolvimento da população não apenas face ao combate à degradação dos solos, mas sobretudo na prevenção do que estes problemas podem representar para o seu quotidiano. A este nível, verificou-se que, no que se refere às acções que os residentes se predispõem a fazer, a mais apontada foi a disponibilidade para participar em acções de sensibilização à população, e ainda a preservação da natureza e do coberto vegetal existente.

Considerando os factores antropogénicos como determinantes nos processos de degradação do solo na Ilha de Porto Santo, tentou-se conhecer a opinião da população (residentes e visitantes) relativamente aos componentes ambientais mais afectados pela acção humana. Neste contexto, a opinião dos residentes recai em primeiro lugar sobre o sistema dunar, depois a vegetação e de seguida a paisagem e o solo, enquanto os visitantes consideram que a primeira componente ambiental mais afectada é a vegetação, em segundo o solo e de seguida o sistema dunar e a paisagem. É interessante verificar esta diferença de opinião, entre residentes e visitantes. Sendo a praia um ex-libris da Ilha, aspecto este referido pelo SRARN: *“Veja-se que o grande trunfo de Porto Santo, é sem dúvida a praia ...”*, verifica-se assim, uma grande preocupação da população residente com o sistema dunar, pois reconhecem que a destruição do mesmo irá destruir consequentemente a praia. A razão mais apontada pelos residentes para justificar de que modo é que o sistema dunar está a ser afectado, foi a pressão da construção junto ao cordão dunar.

A vegetação foi a componente ambiental mais assinalada por parte dos visitantes, e as razões apontadas por residentes e visitantes relativamente à influência humana sobre este componente, também diferem. Os residentes apontam, como principal razão, o facto da florestação ser insuficiente, ou seja, que o modo como o homem tem afectado esta componente tem a ver essencialmente com a falta de plantação de mais árvores nativas, enquanto os visitantes referem a diminuição da biodiversidade/desaparecimento da vegetação e mesmo eliminação de endemismos.

Ainda relativamente às razões apresentadas sobre o modo como a acção humana tem afectado o solo, existiram igualmente opiniões distintas entre os residentes e visitantes, uma vez que os residentes atribuem maioritariamente ao abandono da agricultura, à exploração de pedreiras e extracção de areia e ainda à poluição e os visitantes atribuem à intensificação da erosão, à construção sem planeamento e ainda à falta de vegetação.

Estas diferenças de opiniões entre os residentes e visitantes poderão ser entendidas, segundo a análise de Figueiredo (2003), relativamente à concepção que residentes e visitantes fazem da natureza e do ambiente, pelo facto de os residentes

possuírem, da natureza e do ambiente, concepções que podemos definir como essencialmente antropocêntricas, enquanto que os visitantes concebem aqueles aspectos a partir de uma perspectiva ecocêntrica.

III.4.3 Percepção face à valorização do coberto vegetal como combate ao processo de desertificação

Um dos primeiros passos a tomar para combater a desertificação é promover a reabilitação dos ecossistemas degradados (Mainguet e Silva 1998). Esta deverá iniciar-se com a reabilitação do solo, pois tal como refere Louro (2004), de entre uma série de métodos tradicionais bem conhecidos de combate à desertificação, na sua maioria eles tentam relacionar o melhoramento das condições do solo com a melhoria da retenção da água. Neste contexto, uma das prioridades para restaurar o equilíbrio natural de um ecossistema, será através da reflorestação utilizando principalmente espécies arbóreas indígenas/nativas e plantas herbáceas (Mainguet e Silva 1998; Louro 2004).

Neste âmbito, uma das preocupações desta investigação foi a de conhecer a percepção da população residente e visitante e, ainda, das entidades e dos especialistas entrevistados no que concerne à valorização do coberto vegetal como minimização da desertificação.

Verificou-se assim, que mais de dois terços dos inquiridos, tanto residentes como visitantes, concordam com a valorização do coberto vegetal na Ilha de Porto Santo, como medida importante no combate ao processo de desertificação. De igual modo, a visão das entidades e dos especialistas é unânime em considerar que esta é uma medida importante a ser tomada na Ilha, nomeadamente através da continuação dos esforços de reflorestação. As principais razões apontadas para justificar a importância desta medida, tanto pelos residentes como pelos visitantes e também referidas por algumas entidades e especialistas, foi maioritariamente, a protecção dos solos da erosão/conservação e estabilização do solo e o aumento da pluviosidade, contribuindo para a retenção da água nos solos e manutenção dos aquíferos. Os residentes mencionaram também a importância da valorização do património natural, uma vez que esta medida deverá ter em atenção a preservação da vegetação já existente bem como o repovoamento florestal com espécies nativas. Ambos os tipos de inquiridos (residentes e visitantes) salientam, ainda, que esta é a medida mais adequada para o combate à desertificação e uma mais valia para o ambiente da Ilha.

Considerando o facto de que a florestação com espécies arbóreas indígenas/nativas é essencial para a restauração do equilíbrio natural dos ecossistemas (Mainguet e Silva 1998), tentou-se analisar qual a percepção dos residentes quanto ao conhecimento das espécies vegetais nativas da Ilha de Porto Santo, sendo que cerca de dois terços afirmam conhecer estas espécies. Contudo, ao indicarem quais as espécies nativas que consideram devem ser usadas para o repovoamento florestal, verificou-se que algumas das espécies indicadas não correspondem a espécies nativas mas sim a exóticas, e para além disso, cerca de metade dos residentes não sabe ou não responde à questão, o que revela um desconhecimento destas espécies. Por um lado, consideram que estas espécies devem ser usadas na reflorestação mas, por outro, desconhecem de que espécies se tratam.

Apesar de algum desconhecimento das espécies nativas, cerca de metade da população residente apresenta razões para justificar a importância da utilização destas espécies, nomeadamente: o facto destas espécies serem as que melhor se adaptam às condições do solo e climáticas da Ilha, a preservação das espécies nativas, a diversificação da vegetação por forma a evitar as consequências negativas de uma monocultura, bem como a recuperação da estabilidade do ecossistema natural e original da Ilha e ainda a protecção dos solos.

Relativamente à evolução do coberto vegetal na Ilha de Porto Santo, na opinião dos seus habitantes, este tornou-se cada vez mais escasso e menos diversificado. Quanto à percepção que é feita do coberto vegetal actualmente, os residentes caracterizaram-no como pouco abundante, embora houvesse uma divisão das opiniões quanto ao facto de ser mais ou menos diversificado. Mais de dois terços dos visitantes classificaram o coberto vegetal como escasso. Verifica-se aqui uma ligeira distinção entre a caracterização feita pelos dois tipos de inquiridos (residentes e visitantes), ou seja, na visão dos visitantes, a Ilha apresenta-se com muito menos vegetação do que na visão dos residentes. Poder-se-á explicar esta diferença através da apreciação feita por Figueiredo (2003), que refere que os habitantes manifestam uma concepção de natureza muito marcada pelo seu “valor de uso”, enquanto o “valor de apreciação estética” é o que sobressai mais das representações de que o grupo de visitantes é portador.

A opinião das entidades e dos especialistas é concordante com a dos residentes, ou seja, que se trata de um coberto vegetal pouco abundante, embora salientem a existência de uma área significativa da Ilha que está florestada, como referiu o DRF: *“Hoje é já possível identificar uma extensa mancha florestal na Ilha que cobre mais de 10 % da sua área total e que retribui o verde ao Porto Santo. Estão também criadas as condições para a expansão ... do coberto florestal indígena de Porto Santo.”* (pg. 232). A opinião do DJBM é

também de um coberto vegetal pouco abundante, remetendo ainda para o facto de ser pouco diversificado e para o aspecto da existência de uma monocultura com resinosas: *“A maior parte do coberto vegetal de Porto Santo é herbáceo, e algum arbustivo e arbóreo, em quantidade reduzida. ... o coberto arbóreo é exótico, ... dominado pelo Cupressus macrocarpa e Pinus halepensis, enquanto que nas escarpas ... de alguns picos encontramos aí o resto da vegetação e flora primitiva de Porto Santo.”* (pg. 233). Ainda relativamente a este assunto, o EA afirma que considera o coberto vegetal actual: *“Muito artificial, ainda muito incompleto, embora que o existente tenha como justificação, justamente atenuar os processos de erosão que estavam em curso ...”* e acrescenta relativamente ao futuro o seguinte: *“(...) Parece-me que seja de facto a altura para repensar todo o processo de revestimento florestal de Porto Santo, e de irmos para uma arborização mais significativa de espécies características de Porto Santo.”* (pg. 235).

Verifica-se, pelas transcrições anteriores, que a opinião de algumas das entidades e dos especialistas acerca da caracterização actual do coberto vegetal da Ilha, remete também para o problema da monocultura com espécies exóticas. De igual modo, cerca de metade dos residentes mostraram concordância com a existência de zonas na Ilha florestadas que se restringem essencialmente a uma monocultura com resinosas, tendo referido que um dos principais perigos é a maior predisposição ao ataque de pragas e doenças, bem como, a perda de biodiversidade.

De acordo com Louro (2004), a promoção de novas ferramentas de combate à desertificação como sejam a combinação de métodos tradicionais com as tecnologias modernas deverá ser incentivada.

A investigação desenvolvida no âmbito desta dissertação recorreu à utilização de novas metodologias afim de combater o processo de degradação do solo nalgumas zonas da Ilha de Porto Santo. Deste modo, recorreu-se a técnicas de biotecnologia vegetal (cultura in vitro) para a propagação em larga escala de espécies de *Olea*, nomeadamente da espécie endémica do Arquipélago da Madeira, *Olea maderensis*. A escolha desta espécie, como modelo de estudo, foi feita, considerando que esta espécie é diagnosticada como espécie sensível (ocorrem apenas alguns exemplares isolados e em número muito reduzido), sendo privilegiada na utilização em programas de reflorestação da Ilha, como alternativa às coníferas, por adaptar-se bem às condições climáticas e apresentar uma boa propensão para o combate aos processos erosivos (ver Parte II).

Relativamente ao grau de conhecimento que os residentes e os visitantes possuem desta espécie nativa e endémica, verificou-se que mais de metade dos residentes afirma conhecer a espécie e apenas um terço dos visitantes diz conhecê-la. Esta diferença dos resultados entre os dois tipos de inquiridos (residentes e visitantes) era

expectável, considerando tratar-se de uma espécie nativa do Arquipélago da Madeira, sendo que, provavelmente, os visitantes que afirmam conhecer esta espécie, são provenientes da Ilha da Madeira. Contudo, quando se questionou os residentes acerca dos locais onde observaram esta espécie, verifica-se que, na sua maioria, os locais mencionados se referem a zonas onde existe a oliveira introduzida (*Olea europaea*) e não a nativa/endémica (*Olea maderensis*), o que revela um profundo desconhecimento da espécie nativa.

Não obstante, os residentes identificaram algumas das funções mais importantes da oliveira brava assim como de outras folhosas, nomeadamente, boa conservação do solo, combate da erosão do solo, fundamental para o aumento da biodiversidade e a conservação de água e fornecimento de água ao solo.

Tanto por parte dos residentes como dos visitantes, existe aceitação na reintrodução da oliveira brava na florestação da Ilha, apesar de apenas cerca de metade de cada tipo de inquiridos responder a esta questão, e justificam com o facto desta ser uma espécie endémica e nativa e por isso terá uma boa adaptação ao solo e ao clima da Ilha, irá também proteger o solo da erosão e por ser uma espécie muito resistente à seca e aridez.

De igual modo, algumas das entidades e especilaistas exprimiram a sua opinião quanto à utilização da oliveira brava em programas de reflorestação da Ilha tendo o DRF afirmado o seguinte: *“Sem duvida que a Olea maderensis é uma espécie importantíssima nos projectos de reflorestação de Porto Santo, por se tratar de uma espécie indígena.”* (pg. 237). Também o EA concordou com a utilização desta espécie, tendo salientado algumas das suas principais funções: *“(…) esta é uma espécie indígena, ... é uma espécie com o seu interesse, não é uma espécie de grande porte, mas é uma folhosa, com um grande interesse nos processos fisiológicos da própria vegetação é uma espécie altamente resistente à seca e às condições de solo de Porto Santo. Portanto tem todas as condições para vir a ser uma planta que complemente e complete qualquer processo de rearborização no Porto”* (pg. 238). Em consenso com o que foi dito antes, o MF referiu: *“Sim concordo, pois esta é uma espécie que se adaptará mais às condições climáticas de Porto Santo, é uma espécie mais resistente, como comprovam as que ainda existem, ... É mesmo uma boa espécie como combate aos processos erosivos.”* (pg. 239).

No que se refere à opinião dos residentes e visitantes relativamente à aplicação de novas metodologias no âmbito dos processos de reflorestação da Ilha, verificou-se, no caso dos residentes, que apenas cerca de metade emitiram uma opinião, sendo que destes, um terço afirma nunca ter pensado neste assunto ou então pura e simplesmente não sabe ou não responde, tendo apenas os restantes concordado com a utilização de novas metodologias. No caso dos visitantes também ocorreu que

apenas cerca de metade dos inquiridos emitiram opinião acerca deste assunto, e cerca de um terço apresentaram concordância, contudo existiram muito menos pessoas que afirmaram nunca ter pensado no assunto relativamente aos residentes. Esta diferença poderá dever-se mais uma vez ao nível de escolarização da amostra de inquiridos.

Quanto às razões apresentadas pelos inquiridos que concordam com a utilização de métodos mais avançados para ajudar a reflorestação da Ilha, existiram opiniões idênticas entre os residentes e os visitantes, que referem que é importante a existência de novos métodos porque é urgente a necessidade de reflorestação da Ilha e dizem ainda que se os métodos são eficazes e podem beneficiar, é importante utilizá-los. Outros aspectos referidos têm a ver com o facto de serem importantes métodos para aumentar e diversificar o repovoamento florestal, e para preservação de espécies.

No geral, e considerando o contacto tido com os inquiridos durante a realização dos inquéritos por questionário, verificou-se um grande desconhecimento, principalmente por parte da população residente, acerca da existência de novas metodologias, nomeadamente da biotecnologia vegetal, para ajudar à propagação de espécies afim de serem utilizadas em programas de reflorestação.

No caso das entidades e dos especialistas, de uma forma geral, todos concordaram com a aplicação destas novas metodologias para ajudar os programas de reflorestação. Contudo, apresentaram algumas preocupações, nomeadamente ao nível dos custos da aplicação destas técnicas, da qualidade das plantas obtidas, da diversidade genética e dos “timings” necessários para a realização com sucesso dos projectos preconizados.

Sardinha (2008) refere que abordagens integradas, como sejam projectos de investigação florestal em conjugação com um aumento de gestão integrada do solo e da água e de políticas efectivas, podem ser inicialmente caras devidas ao desenvolvimento tecnológico, e podem também ter uma lenta expressão na melhoria ambiental, mas o seu efeito multiplicativo a longo prazo pode ser decisivo na conservação e aumento da biodiversidade e de serem capazes de proporcionar um modo de vida aceitável para as populações destas áreas de risco.

Relativamente à avaliação feita, por parte da população residente, sobre a actuação da DRF na Ilha de Porto Santo, apesar de não ser a maioria, existe um reconhecimento de que a actividade levada a cabo foi meritória, contudo, consideram que deveria ter sido maior ou que muito ainda falta fazer. No entanto, as entidades entrevistadas referiram, relativamente a este assunto, uma das dificuldades em avançar com os trabalhos de reflorestação, nomeadamente o facto da intervenção florestal ficar bastante condicionada aos terrenos propriedade do Governo Regional,

mas na generalidade todas as entidades reconhecem o excelente trabalho que tem sido desempenhado pela DRF até à data.

Finalmente, considerando as características da Ilha de Porto Santo, nomeadamente a sua dimensão e todos os problemas inerentes ao facto de ser um ecossistema sensível, e ainda face ao actual desenvolvimento económico, as entidades teceram algumas considerações: O DJBM referiu, por exemplo: *“Em Ilhas pequenas, às vezes, torna-se difícil conciliar a conservação com o desenvolvimento económico... é necessário ... estudar muito bem e redimensionar, ... até que dimensões o Porto Santo tem determinada capacidade. ... É necessário e urgente delimitar quais são as áreas com uma determinada dimensão a serem conservadas, que é pelo menos para manter nalgumas zonas a vegetação e os ecossistemas naturais.”*

A este nível, o DRF salientou um aspecto importante que deve ser considerado: *“Ao nível da área florestal, ou melhor espaço florestal de Porto Santo a pressão existente prende-se sobretudo com a componente lúdica, cada vez mais a população local, bem como os visitantes procuram os espaços florestais para as suas actividades lúdicas. Este é um bom pressuposto da sustentabilidade ambiental em que o Homem não é excluído de todo o processo, e se hoje existe maior usufruto por parte da população no que se refere ao espaço florestal, então significa que existe alterações não só a nível comportamental das populações mas também a nível do próprio espaço florestal, saindo ambas as partes (ambiente e população) beneficiados.”*

III.5 Conclusões

A degradação dos solos/desertificação na Ilha de Porto Santo é reconhecida por grande parte da comunidade como sendo fortemente relacionada, por um lado, com a existência de solos desflorestados ou com vegetação escassa, o que torna os solos empobrecidos/desqualificados e cada vez mais erosionados e, por outro lado, com o facto da Ilha ser pequena e, como tal, ser classificada como um ecossistema frágil. Apesar das causas serem na sua maioria atribuídas, tanto a causas naturais como humanas, em que são identificadas como principais a seca/aridez e a destruição do coberto vegetal, verifica-se, contudo, por parte da população residente, uma forte atribuição do agravamento das causas à influência humana.

A percepção deste problema na Ilha é visível através dos resultados obtidos, uma vez que as pessoas identificam bem as principais consequências do fenómeno, nomeadamente o empobrecimento do solo, a degradação das condições hidrológicas, a degradação das populações animais e vegetais e o agravamento da erosão.

Como forma de atenuar as consequências deste fenómeno na Ilha, as principais medidas propostas pela população foram a recuperação e conservação do coberto vegetal e mais repovoamento florestal e também a necessidade de uma boa gestão das águas de escorrência, nomeadamente a existência de novos sistemas de captação e armazenamento de água. No âmbito da visão institucional, mais precisamente pela entidade que tem a seu cargo o sector florestal, verifica-se que estas são medidas que fazem parte dos projectos a serem continuados na Ilha, e vai mais além ao referir outras medidas de mitigação a serem implementadas, como sejam: a) instalação de espécies exóticas pioneiras que permitam criar condições para o melhoramento do solo, criando microclimas; b) instalação de pontos de água; c) abertura de caminhos florestais; d) correcção torrencial nas linhas de água mais erosionadas e e) recuperação da vegetação indígena de Porto Santo (nos locais onde essa recuperação é possível), através de trabalhos de reprodução e introdução de espécies indígenas e endémicas da flora de Porto Santo. As acções/medidas da DRF na Ilha, são acompanhadas pelo Jardim Botânico da Madeira, através da monitorização, quer das espécies que foram introduzidas, quer principalmente das espécies indígenas e dentro das indígenas as endémicas.

Nota-se, também, que os principais constrangimentos ambientais da Ilha são bem identificados pelas pessoas, como sejam, a vegetação, o solo, a paisagem, o sistema dunar e ainda os recursos hídricos.

A valorização crescente dos espaços florestais, associada à preservação do ambiente e a uma gestão correcta e eficiente por forma a minimizar o processo de desertificação, é uma preocupação tanto da população, como das entidades e dos especialistas entrevistados, uma vez que a maioria concorda que esta seja uma medida importante a ser tomada. As principais razões apresentadas que justificam a tomada desta medida foram a protecção dos solos da erosão, a boa conservação e estabilização do solo, o facto do coberto vegetal contribuir para o aumento da pluviosidade e manutenção dos aquíferos e a valorização do património natural (preservação da vegetação já existente e repovoamento florestal com espécies nativas).

Verifica-se ainda, ao nível da visão institucional, que existe uma preocupação na recuperação de zonas onde é visível a intensa degradação biofísica dos solos, sendo que referem que as medidas a tomar deverão ter em atenção a melhoria do ambiente e da paisagem em prol de um turismo que se quer de qualidade, valorizando o que de melhor o Porto Santo tem na oferta turística (praia, espaços verdes e jardins nos centros urbanos, zonas de recreio e lazer, passeios pedestres, etc.). Esta visão está de acordo com o preconizado pela política de ambiente actualmente em curso na

RAM, que salienta que o Porto Santo, pela sua reduzida dimensão e pela precariedade das relações entre as actividades económicas e os valores ambientais e paisagísticos, constitui um exemplo claro da necessidade imperiosa de conciliar ambiente com desenvolvimento, sob pena de, agindo de outra forma, destruir o próprio suporte desse desenvolvimento (Anon. 2000). Esta preocupação, demonstrada por parte das entidades, vai de encontro à crescente importância da actividade turística na Ilha, nomeadamente ao nível do sector de serviços, uma vez que cada vez mais este é dominado pela importância do turismo que comanda as demais actividades (e.g. comércio) (Parte I).

A população inquirida tem consciência dos principais processos de perda do coberto vegetal na Ilha, uma vez que relativamente à sua evolução, a população classifica-o como tendo-se tornado cada vez mais escasso e menos diversificado. Relativamente à caracterização actual do coberto vegetal, classifica-o como pouco abundante ou mesmo escasso, e cerca de metade da população residente reconhece ainda a existência de uma monocultura na Ilha.

Deste modo, verifica-se que, tanto a população como as entidades e os especialistas reconhecem a importância da utilização de espécies nativas na florestação de algumas zonas da Ilha, uma vez que identificam as principais funções que este tipo de vegetação pode desempenhar ao nível da recuperação dos ecossistemas degradados. Contudo, a população revela um grande desconhecimento das espécies indígenas/nativas da Ilha, incluindo a oliveira brava, espécie utilizada como modelo de estudo no âmbito deste trabalho. No entanto, a este nível a visão dos especialistas, foi muito importante, pois salientam as principais funções que esta espécie poderá desempenhar ao ser utilizada nos programas de reflorestação da Ilha. Não obstante, tanto por parte da população como das entidades e dos especialistas, existe aceitação na reintrodução da oliveira brava na florestação da Ilha.

Considerando as dificuldades que as técnicas tradicionais (estacaria e sementeira) apresentam, nomeadamente uma baixa taxa de sucesso, a recorrência a metodologias mais recentes como sejam técnicas de biotecnologia vegetal (e.g. micropropagação), poderão ser a chave do sucesso para ajudar os programas de reflorestação da Ilha de Porto Santo, utilizando espécies nativas e/ou endémicas da Ilha. No que se refere a este aspecto verificou-se um grande desconhecimento, principalmente por parte da população residente acerca da existência destas novas metodologias, contudo cerca de um terço da população concorda com a aplicação de novas técnicas, pois dizem que se podem beneficiar e ajudar a ter bons resultados é importante utiliza-las pois a necessidade de florestação da Ilha é urgente.

No caso das entidades e dos especialistas entrevistados, verificou-se que de uma forma geral, todos concordaram com a aplicação destas novas metodologias para ajudar os programas de reflorestação, contudo, apresentaram algumas preocupações ao nível dos custos e também em termos de eficácia (obtenção de plantas de qualidade e em quantidade nos “timings” adequados) e ainda em termos da diversidade genética.

O grande esforço dos serviços da DRF para combater o grave estado de degradação biofísica a que terão chegado os solos da Ilha de Porto Santo, é reconhecido pela população residente. Contudo, o facto de existirem zonas na Ilha onde esta degradação dos solos/desertificação ainda é visível, leva a população a classificar, que de um modo geral, os trabalhos da DRF são insuficientes, por sentirem que existe a necessidade de mais reflorestação bem como de preservação do coberto vegetal existente, e a necessidade de uma melhor gestão dos recursos hídricos, nomeadamente haver um melhor armazenamento de águas pluviais para serem utilizadas durante os períodos de secas prolongadas.

III.5.1 Algumas recomendações

Com base nos resultados obtidos e ainda nas preocupações e comentários tecidos tanto pelos residentes como pelos visitantes e ainda pelas entidades e pelos especialistas, serão indicadas algumas recomendações, que não pretendem ser mais do que um apoio ao desenvolvimento de políticas e estratégias fiáveis de combate à degradação dos solos / desertificação na Ilha de Porto Santo.

- Valorização dos espaços florestais, associada à preservação do ambiente e a uma gestão correcta e eficiente: apoiar a preservação e manutenção de uma permanente cobertura de espécies arbóreas e arbustivas.
- Utilização de espécies indígenas/nativas nos programas de reflorestação, com vista à diversificação da flora e para o equilíbrio dos ecossistemas da Ilha.
- Conservação do solo e da água: dar especial atenção à reflorestação e aos sistemas agrícolas com vista à conservação e manutenção da fertilidade do solo, e que simultaneamente reduzam a erosão e aumentem a capacidade do solo para reter água disponível.
- Adopção de procedimentos de minimização dos efeitos das secas e elaboração de um plano de contingência para períodos de seca.

- Estabelecimento de uma metodologia para a gestão dos recursos hídricos de superfície para o melhoramento da captação e armazenamento das águas pluviais, afim de ser utilizada para a rega durante períodos de seca.
- Incentivo financeiro para o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias/ técnicas modernas (e.g. técnicas de biotecnologia vegetal) que em combinação com o conhecimento tradicional possam conduzir a melhores resultados num curto-médio prazo.
- Implementação de políticas de ordenamento do território: conciliar o crescimento urbano/desenvolvimento económico com a preservação da natureza (delimitar áreas a serem conservadas/preservadas e perspectivar áreas para expansão do coberto vegetal), em prol de um ambiente de qualidade tanto para a população local como para a visitante.
- Sensibilização constante da população tanto residente como visitante: cativar a população para conservação/preservação da vegetação e restauração de ecossistemas degradados através da disponibilização de informação (dando a conhecer as espécies nativas da Ilha) e actividades lúdicas.
- Acções de formação à população: com vista ao aumento de capacidades para a gestão dos solos e vegetação, incentivar vínculos entre os vários sectores, e apoiar a formação avançada de pessoal capaz de estabelecer prioridades e planos de gestão.
- Incentivos aos proprietários dos terrenos para mantê-los com vegetação de modo a proteger da erosão.
- Protecção da orla costeira, especialmente nas zonas de maior sensibilidade ecológica e paisagística, relativamente às pressões urbanísticas (e.g. cordão dunar).

Referências

- Andrada E.C. (1990). Repovoamento florestal no Arquipélago da Madeira (1952-1975). Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Lisboa
- Anon. (1999). National Action Programme to Combat Desertification. United Nations Convention to Combat Desertification. Direcção Geral das Florestas e Instituto de Promoção Ambiental, Direcção de Serviços de Valorização do Património Florestal (Ed.). Portugal, Lisboa, Novembro. Acedido em 19 de Fevereiro de 2009 em: <http://www.unccd.int/php/countryinfo.php?country=PRT>.
- Anon. (2000). Plano Regional da Política de Ambiente – Caracterização de base. Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais, Região Autónoma da Madeira.
- Brito G., Santos C., Coelho C. (2004). Estratégias para a Valorização do Coberto Vegetal da Ilha de Porto Santo. 3^{as} Jornadas Florestais Insulares – Potenciar os Recursos Florestais Naturais da Macaronésia. Julho, Terceira, Açores, Portugal. Livro de Resumos, Tema 1, pg.55.
- Coelho C., Valente S., Pinho, L., Carvalho, T., Ferreira, A., Figueiredo, E. (2004). A Percepção Social das Alterações Climáticas e do Risco de Cheia. Comunicação apresentada no 7^o Congresso da Água. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos. LNEC, Lisboa, Março (Book of Congress).
- Durán Zuazo V.H. Francia Martínez J.R., Rodríguez Pleguezuelo C.R., Martínez Raya A., Carcéles Rodríguez B. (2006) Soil-erosion and runoff prevention by plant covers in a mountainous area (se Spain): Implications for sustainable agriculture. *Environmentalist* 26:309-319.
- Figueiredo E.M. (2003). Um Rural para viver, outro para visitar – o ambiente nas estratégias de desenvolvimento para as áreas rurais (Dissertação de Doutoramento em Ciências Aplicadas ao Ambiente), Universidade de Aveiro.
- Filipe M.A. (2007). Contributo da florestação na biodiversidade do Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal (História Natural) Sup. Nº 12: 27-32
- Fordham M. (2000). Participatory planning for flood mitigation. In: Floods. Parker D.J. (ed.), Vol. II. pp. 66-79. London, New York (Inglaterra e E.U.A.), Routledge.
- Franco E.P.C. (1994). Carta dos Solos da Ilha do Porto Santo. Centro de Estudos de Pedologia (Instituto de Investigação Científica Tropical) (ed.). D.R.A., Lisboa.
- Heathcote R.L. (1980). Perception of Desertification. United Nations University, Press, Tokyo.

- INE (2001). Censos 2001, XIV Recenseamento Geral da População, IV Recenseamento Geral da Habitação, Resultados Definitivos Madeira. Instituto Nacional de Estatística, Portugal.
- Landeiro C., Ramos I.L., Saraiva M.G., Silva F.N., Monteiro, F. (2004). Desertificação em Portugal: Incidência no Ordenamento do Território e no Desenvolvimento Urbano. Volume II. Direcção Geral do Ordenamento do Território e Desenvolvimento Urbano. Campo Grande, Lisboa.
- Leeuw S.E. (1999). Degradation and desertification: some lessons from the long-term perspective. In: Mediterranean desertification: resource results and policy implications. Conference proceedings. Balanis, Peters, Tsogad (eds.). European Commission, Volume 1: 17-31.
- Lima M., Pato J. (2006). A participação pública no domínio da água, questões sociais – 1º Relatório de suporte aos trabalhos do Workshop. Centro de Investigação e de Intervenção Social. ISCTE, Junho. Acedido em 19 de Fevereiro de 2009 em: <http://www.lpn.pt/LPNPortal/UserFiles/File/Primeiro%20Relatorio1.pdf>.
- Louro V. (2004). Desertificação, Sinais, Dinâmicas e Sociedade. Instituto Piaget, Lisboa Portugal.
- LPN (2008). A desertificação em Portugal. Liga para a protecção da natureza. Acedido em 19 de Fevereiro de 2009 em: <http://www.lpn.pt>.
- Lucas A.G. (2006). Desertificação – Terras que empobrecem. In: Missionários Combonianos - Revista Além-Mar. Acedido em 27 de Janeiro de 2009 em: <http://www.alem-mar.org/cgi-bin/quickregister/scripts/redirect.cgi?redirect=EEFyEAlAkZzsLXfDyK>
- Mainquet M., Silva G.G. (1998). Desertification and drylands development: what can be done?. Land Degradation and Development 9: 375-382.
- Neves B., Roxo M.J., Santos N. (2008). Percepção do termo “desertificação” na Península Ibérica, fazendo uso das novas tecnologias de informação. Comunicação apresentada no XI Colóquio Ibérico de Geografia. Departamento de Geografia, Universidad de Alcalá. Madrid, Espanha, Outubro (*Book of Congress*).
- Oñate J.J., Peco B. (2005). Policy impact on desertification: ‘stakeholders’ perceptions in southeast Spain. Land Use Policy 22: 103–114.
- Pinho L., Coelho C., Valente S., Figueiredo E., Carvalho T., Ferreira A. (2004). O ‘olhar’ do cidadão sobre as alterações climáticas. Comunicação apresentada na 8ª Conferência Nacional de Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Outubro (*Book of Congress*).
- Quintal R. (2001). Levadas e Veredas da Madeira. Ribeiro F. (ed.). Madeira.

- Santos F., Martins H., Borges J. (2004). Desenvolvimento de Abordagens Participativas no Planeamento Florestal Português. *Silva Lusitana*, nº Especial: 67-76.
- Sardinha R.M.A. (2008). Dryland management and combating desertification through development. *Silva Lusitana* 16(1): 21 – 44.
- Sequeira E.M. (2005). INUAF STUDIA, Desertificação – O Programa de Acção Nacional – O caso do Algarve. Comunicação apresentada no Curso: A Gestão dos Recursos Naturais face ao desafio da Desertificação. Museu da Presidência da República, Lisboa.
- Silva F.N., Saraiva M.G., Ramos I.L., Gomes M.C., Gonçalves V., Monteiro, F. (2004). Desertificação em Portugal: Incidência no Ordenamento do Território e no Desenvolvimento Urbano. Volume I. Direcção Geral do Ordenamento do Território e Desenvolvimento Urbano. Campo Grande, Lisboa.

PARTE IV

Conclusões gerais e perspectivas futuras

IV.1 Conclusões gerais e perspectivas futuras

A dissertação pretendeu desenvolver estudos que visaram a valorização do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo, através da definição de duas metodologias de investigação, apresentadas na Parte II e III, que envolveram:

- a) a aplicação de técnicas de biotecnologia vegetal para a propagação em larga escala, preservação de germoplasma e (re)introdução na Ilha de uma espécie endémica e em risco do Arquipélago da Madeira (*Olea maderensis*) e de uma espécie introduzida (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*).
- b) a avaliação da percepção da comunidade local e visitante, bem como de entidades e especialistas que actuam na área, relativamente ao fenómeno da desertificação e a implementação de medidas mitigadoras onde se inclui o recurso a estratégias alternativas, de valorização do coberto vegetal, envolvendo a biotecnologia (micropropagação) para a minimização dos processos de desertificação em curso.

No âmbito dos estudos desenvolvidos para o estabelecimento da primeira metodologia (Parte II), aproveitou-se o conhecimento existente sobre a micropropagação de *Olea europaea* (Capítulo II.1) para desenvolver novos protocolos de micropropagação (por cultura de segmentos) de duas espécies de oliveira brava (*O. maderensis* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*). Foi possível assim, a optimização da micropropagação da *Olea. maderensis*, desde a propagação in vitro até à aclimatização no campo e de *Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, desde a propagação in vitro até à aclimatização em estufa. A optimização deste processo, permitiu atingir os seguintes objectivos:

- a) produção rotineira de *O. maderensis*;
- b) (re)introdução na Ilha de plantas micropropagadas para integração em programas de reflorestação em curso e combate à desertificação;
- c) valorização do coberto vegetal da Ilha (e.g. protecção do germoplasma em risco, aumento da biodiversidade).

De acordo com os resultados apresentadas na Parte II desta dissertação, destacam-se, assim, os seguintes avanços trazidos por este trabalho:

(i) – As diferentes morfologias reveladas das plantas em campo, assim como a diferente resposta in vitro de indivíduos colhidos, e a inexistência de informação genética sobre as populações de *Olea* no Arquipélago da Madeira, tornaram oportuna

a análise genética (FCM) e molecular (SSRs) de várias espécies de *Olea*: *O. maderensis*, *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*, *O. cerasiformes* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*, possibilitando, deste modo, uma melhor caracterização genética destas espécies uma vez que permitiu a detecção de um nível de ploidia novo, no género *Olea* (tetraploidia). Espera-se, deste modo, que esta informação adicional venha a sustentar novos estudos taxonómicos com vista à clarificação da posição taxonómica da espécie *Olea maderensis*. Para além disso, foi possível encontrar uma grande diversidade genética entre os genótipos de *O. maderensis* e entre *O. maderensis* e *O. Cerasiformis*. Considerando a fiabilidade genética destes estudos, estes dados são assim importantes para o estabelecimento de estratégias prioritárias de programas de conservação de espécies nativas e raras presentes nestas ilhas (Capítulo II.2).

(ii) – Dadas as especificidades da *O. maderensis* (e.g. recalcitrância na presença de meio OM), optimizou-se as condições de inoculação e cultura (e.g. desinfecção, composição do meio de cultura) desta espécie. Deste trabalho ressalta o desenvolvimento de um novo meio (OMG, baseado no meio OM) que permitiu a propagação em larga escala, e com excelente “performance” (e.g. avaliação morfológica e fisiológica) desta espécie endémica. (Capítulo II.3). Em contrapartida a espécie *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris* apresentou uma boa resposta em meio OM (Capítulo II.4).

(iii) – A potencial inclusão destas plantas micropropagadas na ilha, contribuindo assim para a valorização do coberto vegetal, só será válida se for assegurado que os protocolos optimizados permitem uma propagação “true-to-type”. Para isso, avaliou-se (nas duas espécies de oliveira brava) possíveis ocorrências de variabilidade genética em indivíduos micropropagados, recorrendo a técnicas de FCM (fidelidade clonal da ploidia) e SSRs (estabilidade genética). A informação obtida permitiu concluir que, apesar das duas espécies em estudo (*O. maderensis* e *O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) necessitarem de requisitos diferentes nas condições de cultura, os protocolos desenvolvidos mostraram grande eficiência e boa qualidade das plantas tanto ao nível morfológico como genético (Capítulo II.4).

(iv) – A aplicação de um protocolo eficiente requer que haja sucesso na transposição para as condições de campo (onde as plantas são expostas às condições áridas da ilha). Com este trabalho foi possível desenvolver um método eficiente de aclimatização de *O. maderensis*, que permitiu taxas de sobrevivência elevadas às condições de campo, contribuindo deste modo, para a definição de um protocolo de propagação em larga escala (Capítulo II.5). Este protocolo está presentemente a ser utilizado em programas de reflorestação em curso na Ilha de

Porto Santo, tornando-se possível, assim, simultaneamente a preservação de germoplasma em campo e a integração de plantas no campo, contribuindo para a valorização do coberto vegetal e consequentemente para a minimização do processo de desertificação (Capítulo II.6).

Em conclusão sobre o desenvolvimento desta metodologia de investigação, os avanços na propagação e reintrodução de espécies de *Olea*, tanto endémicas como outras entretanto introduzidas no século passado, permitem a curto/médio prazo a introdução destas espécies no coberto florestal (e.g. em combinação com as populações existentes de *Pinus*). Esta introdução, se alargada ao maior número possível de genótipos de *Olea*, e a outras espécies (e.g. *Juniperus*) constituirá um exemplo de sucesso de ferramentas de biotecnologia na conservação/protecção de ecossistemas em risco (ver também Capítulo II.6).

A segunda metodologia de investigação desenvolvida (Parte III), referente à avaliação da percepção da população (residente e visitante), bem como das entidades e dos especialistas, permitiu constatar que existe uma nítida consciência da situação de risco da ilha, e da premência de resolução do problema. Esta consciência é independente dum conhecimento sobre as espécies nativas da ilha, e está em geral patente quer em residentes quer em visitantes. Acresce ainda, sobretudo nos residentes, um conhecimento do esforço desenvolvido pelas entidades, mas também reconhecido como ainda não suficiente.

Face ao recurso de estratégias alternativas envolvendo biotecnologia, e apesar de reconhecerem algum desconhecimento, concluiu-se ainda que a população inquirida manifesta grande aceitação, desde que essas estratégias valorizem o coberto e assim, ajudem a combater a degradação biofísica dos solos.

Ressalva-se ainda que, tanto as entidades como os especialistas, apesar de estarem em geral em sintonia com a população, revelam, como seria de esperar, algumas preocupações face a potenciais impactos da implementação destas estratégias, nomeadamente, e por exemplo, custos, qualidade e quantidade de plantas e diversidade genética.

É ainda patente a consciência das entidades que a valorização do coberto vegetal trará benefícios não só para a preservação do ambiente como para a promoção de actividades turísticas com inegáveis vantagens económicas para a Ilha.

Assim, a opinião das populações e das entidades e especialistas, vai de encontro, em geral, ao defendido por nós, em que abordagens integradas na melhoria ambiental podem ser decisivas para a valorização do coberto vegetal contribuindo deste modo,

para a conservação e aumento da biodiversidade e de serem capazes de proporcionar benefícios na qualidade de vida das populações destas áreas de risco.

Em conclusão, o desenvolvimento destes estudos, através da fusão de duas metodologias de investigação, permitiu, para além do enriquecimento pessoal da autora (natural de Porto Santo), disponibilizar uma série de ferramentas que, se devidamente aproveitadas, poderão constituir um apoio na tomada de decisões/medidas que permitam, no curto/médio prazo, dar um contributo para a valorização do coberto vegetal da Ilha de Porto Santo, e assim minimizar o grave problema ambiental da Ilha. Por outro lado, a autora sente que o trabalho desenvolvido nesta dissertação, podendo ter esclarecido algumas questões, levantou muitas outras, e será, assim, pertinente a continuidade destes estudos no sentido de procurar respostas que consolidem as estratégias de preservação ambiental da Ilha.

Finalmente, o trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação, poderá constituir um exemplo a ser aplicado em outros ecossistemas, em risco, assim como será vantajoso estudar a possibilidade de serem aplicadas, em Porto Santo, as estratégias que já tenham sido bem sucedidas em locais com problemas semelhantes.

ANEXOS

Anexo I

**Folheto informativo para utilização em campanhas de sensibilização
sobre a micropropagação de oliveira brava**

O QUE É A MICROPROPAGAÇÃO?

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos *in vitro* que pode ser definida como a propagação de plantas em condições assépticas, num meio de cultura cuja composição é conhecida (macro e micronutrientes, açúcares, vitaminas e reguladores de crescimento), sob condições de luz e temperatura controladas.



© Gina Brito, 2008

Projecto desenvolvido no âmbito do Doutoramento
em Biologia:

“Estratégias para a Valorização do Coberto Vegetal da Ilha de Porto Santo”

Responsáveis pelo Projecto:

Gina Maria Oliveira Brito
(Mestre, Doutoranda em Biologia na UA)

Maria da Conceição Santos
(Professora Associada com Agregação do
Departamento de Biologia da UA)

APOIOS



universidade
de aveiro



departamento
de biologia

MICROPROPAGAÇÃO DE Oliveira Brava ou Zambuheiro (*Olea maderensis*)



© Gina Brito, 2008

Universidade de Aveiro, 2009

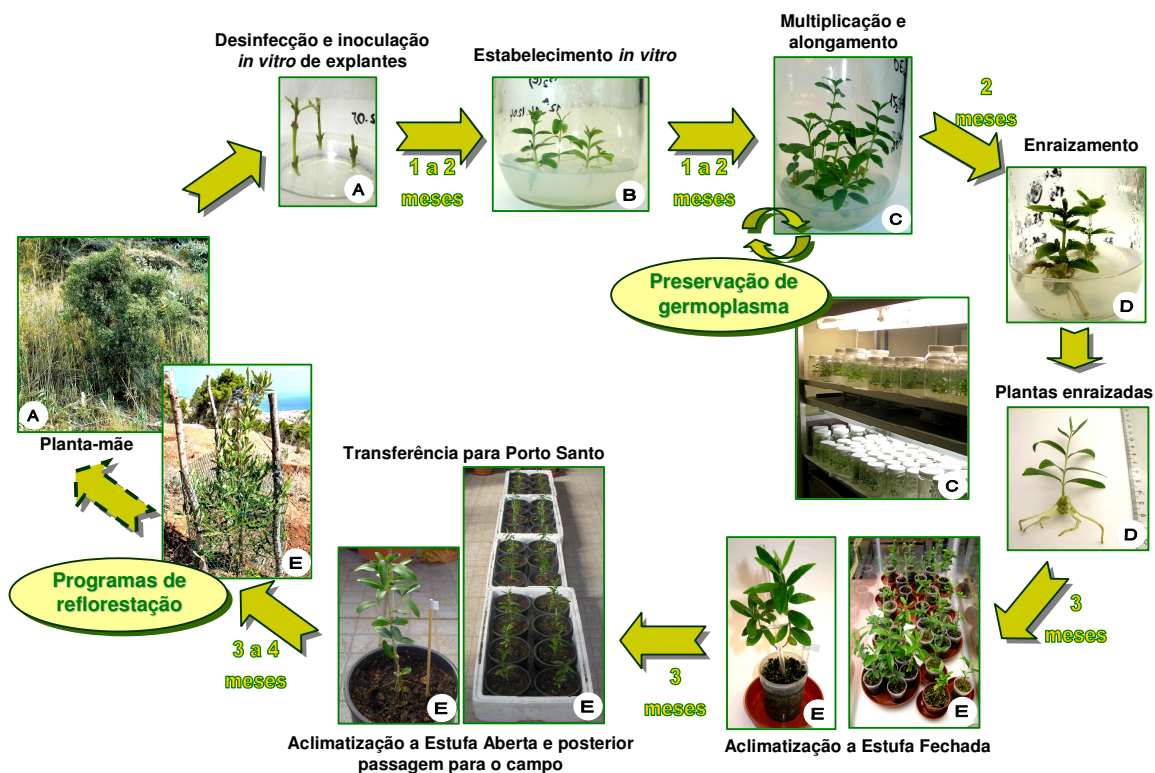
OBJECTIVOS DO PROJECTO

- Preservação de espécies nativas/endémicas utilizando como modelo de estudo a espécie *Olea maderensis*
- Integração de plantas micropropagadas na ilha de Porto Santo, no âmbito de Programas de Reflorestação da Direcção Regional de Florestas da RAM.

CONDIÇÕES DE CULTURA

- Um fragmento de tecido vegetal (explante) é colocado em meio de cultura em condições de assépsia, isto é, num meio isento de microrganismos.
- O meio de cultura terá que satisfazer todos os requisitos nutritivos da planta. Assim, deverá ser rico em sais minerais, açúcares (fonte de carbono), vitaminas e reguladores de crescimento (hormonas).
- Todos os componentes do meio são essenciais, no entanto, os reguladores de crescimento são fundamentais no desenvolvimento da planta.
- Os explantes têm de se encontrar sob condições de luz (fotoperíodo) e temperatura controladas.

Micropropagação de *Olea maderensis* (Lowe) Rivas Mart. and Del Arco (2002)



© Gina Brito, 2008

FASES DA MICROPROPAGAÇÃO

- Fase 1 (A) - Selecção da planta mãe e preparação do explante.
- Fase 2 (B) - Estabelecimento de uma cultura asséptica.
- Fase 3 (C) - Fase de multiplicação e alongamento.
- Fase 4 (D) - Enraizamento.
- Fase 5 (E) - Aclimatização.

Anexo II

**Guião do inquérito por questionário aos residentes
da Ilha de Porto Santo (IQR)**

INQUÉRITO
- VALORIZAÇÃO DO COBERTO VEGETAL EM ÁREAS AMBIENTALMENTE SENSÍVEIS –
- O EXEMPLO DA ILHA DE PORTO SANTO –

N.º de Inquérito _____

O presente Inquérito, é realizado com o apoio da Câmara Municipal do Porto Santo, e destina-se a um trabalho de investigação para realização de um Doutoramento na Universidade de Aveiro, intitulado:

“Estratégias para a Valorização do Coberto Vegetal da Ilha do Porto Santo”.

Pedia a melhor colaboração no seu preenchimento, agradecendo desde já o tempo que puder disponibilizar.

CARACTERIZAÇÃO GERAL

1. Residência

1. Freguesia _____
2. Sítio _____

2. Idade

1. 15 - 19 anos ☐
2. 20 - 29 anos ☐
3. 30 - 39 anos ☐
4. 40 - 49 anos ☐
5. 50 - 59 anos ☐
6. 60 - 69 anos ☐
7. > 70 anos ☐

3. Sexo

1. Feminino ☐
2. Masculino ☐

4. Estado Civil

1. Solteiro ☐
2. Casado ☐
3. Viúvo ☐
4. Divorciado/ Separado ☐
5. União de Facto ☐

5. Nível de Escolaridade

1. Analfabeto ☐
2. Sabe ler e escrever sem frequentar a escola ☐
3. 1.º CEB ☐
4. 2.º CEB ☐
5. 3.º CEB ☐
6. Ensino Secundário ☐
7. Ensino Médio ☐
8. Ensino Superior ☐
9. Outro. Qual? _____ ☐

6. Condição perante o trabalho

1. Exerce uma actividade económica ☐
2. Exerce mais de uma actividade económica ☐
3. Desempregado ☐
4. Estudante ☐
5. Doméstico ☐
6. Reformado ☐
7. Incapacitado perante o trabalho ☐
8. Outra. Qual? _____ ☐

7. Profissão Actual ou Última (no caso de estar reformado ou desempregado)?

8. No caso de exercer mais do que uma actividade, que outra(s) exerce?

9. Situação na profissão principal

- | | |
|--|--------------------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> |
| 1. Patrão | <input type="checkbox"/> |
| 2. Trabalhador por conta própria | <input type="checkbox"/> |
| 3. Trabalhador por conta de outrem | <input type="checkbox"/> |
| 4. Trabalhador familiar não remunerado | <input type="checkbox"/> |
| 5. Outra. Qual? _____ | <input type="checkbox"/> |

10. Pertence a algum Movimento Associativo, Clube Desportivo, ou pratica alguma actividade nos tempos livres? Qual?

ÁREAS AMBIENTALMENTE SENSÍVEIS / DESERTIFICAÇÃO

11. Já ouviu falar em áreas ambientalmente sensíveis?

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 12)

11.1. O que entende por áreas ambientalmente sensíveis?

12. Já ouviu falar em degradação do solo / desertificação?

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 16)

12.1. O que entende por degradação do solo / desertificação?

13. Na globalidade, quais as causas que atribui ao processo de degradação do solo / desertificação?

- | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. São só devidas a causas naturais | <input type="checkbox"/> | |
| 2. São só devidas à acção do Homem | <input type="checkbox"/> | Especifique? _____ |
| 3. Devidas a ambas | <input type="checkbox"/> | Especifique? _____ |
| 4. São só devidas à vontade de Deus | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

14. Quais as consequências do processo de desertificação? (assinale 4 no máximo)

- 0. Não se aplica ☐
- 1. Degradação das populações animais e vegetais ☐
- 2. Empobrecimento do solo ☐
- 3. Alteração das condições hidrológicas de superfície devido à perda da cobertura vegetal ☐
- 4. Alteração das condições geo-hidrológicas (águas subterrâneas) ☐
- 5. Solo fértil, com muita vegetação ☐
- 6. Abandono da actividade agrícola ☐
- 7. Despovoamento ☐
- 8. Outra. ☐ Qual? _____
- 99. Não sabe/ Não responde ☐

15. O conhecimento que adquiriu sobre os problemas de desertificação, provém fundamentalmente:

- 0. Não se aplica ☐
- 1. dos meios de comunicação social (TV; Rádio; Jornais; etc.) ☐
- 2. conhecimento técnico ☐
- 3. conversas com familiares e amigos ☐
- 4. vivência do problema ☐
- 5. pelo contacto directo com a ilha de Porto Santo ☐
- 6. por aprendizagem ☐
- 7. Outra. ☐ Qual? _____
- 99. Não sabe/ Não responde ☐

16. Considera que a ilha do Porto Santo é uma área ambientalmente sensível / sofreu degradação do solo devido à acção humana e da natureza (processo de desertificação ao longo dos tempos)?

- 1. Sim ☐ Porquê? _____
- 2. Não ☐ Porquê? _____
- 99. Não sabe/ Não responde ☐

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 21)

16.1. Quais as causas que atribui ao processo de degradação do solo / desertificação, na ilha?

- 0. Não se aplica ☐
- 1. São só devidas a causas naturais ☐
- 2. São só devidas à acção do Homem ☐ Especifique? _____
- 3. Devidas a ambas ☐ Especifique? _____
- 4. São só devidas à vontade de Deus ☐
- 5. Outra. ☐ Qual? _____
- 99. Não sabe/ Não responde ☐

17. De que forma é que o processo de desertificação tem afectado a ilha do Porto Santo? (assinale 5 no máximo)

- 0. Não se aplica ☐
- 1. Ainda não afectou ☐
- 2. Agravamento da erosão ☐
- 3. Degradação dos solos ☐
- 4. Escassa vegetação ☐
- 5. Perda de biodiversidade ☐
- 6. Abandono das actividades agrícolas/pecuária/silvícola ☐
- 7. Recursos naturais limitados ☐
- 8. Recursos hídricos limitados ☐
- 7. Emigração ☐
- 8. Vão afectar no futuro ☐ Especifique: _____
- 9. Outra. ☐ Qual? _____
- 99. Não sabe/ Não responde ☐

(Se respondeu que ainda não afectou, passe para a questão 21)

18. Quais as medidas necessárias para atenuar as consequências do processo de desertificação? (assinale 8 no máximo)

- | | | |
|---|--------------------------|-------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Já não há nada a fazer | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Não se pode fazer nada | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Recuperação e conservação do coberto vegetal | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Repovoamento florestal | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Recuperação de práticas agrícolas tradicionais | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Novas práticas agrícolas | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Gestão das águas de escorrência | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Novos sistemas de captação e armazenamento de água | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Reutilização da água | <input type="checkbox"/> | |
| 10. Retirada de gado das serras | <input type="checkbox"/> | |
| 11. Protecção da paisagem | <input type="checkbox"/> | |
| 12. Aplicação de políticas de ordenamento do território | <input type="checkbox"/> | |
| 13. Incentivos às populações | <input type="checkbox"/> | |
| 14. Aplicação de multas e coimas | <input type="checkbox"/> | |
| 15. Sensibilização das pessoas | <input type="checkbox"/> | |
| 16. Voltar a fazer as coisas como antigamente | <input type="checkbox"/> | |
| 17. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

(Se respondeu que não se pode fazer nada, passe para a questão 21)

19. Na sua opinião, acha que têm sido tomadas medidas para combater os problemas de desertificação que a ilha de Porto Santo enfrenta?

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> |

19.1. Em caso afirmativo, diga quais e quem (entidade) tomou essas medidas? _____

20. O que está disposto a fazer para ajudar na minimização deste problema? _____

21. Tem sentido que a acção humana tem afectado alguns dos seguintes componentes ambientais, na ilha do Porto Santo? Assinale os 4 que considera mais afectados e diga de que modo foi afectado.

- | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|
| 1. Solo | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 2. Vegetação (Flora) | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 3. Fauna | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 4. Sistema dunar | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 5. Recursos hídricos | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 6. Paisagem (valores culturais e históricos) | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 7. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual e de que modo? _____ |
| | | |
| 8. Não sentiu nenhuma degradação | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Não sentiu em nenhum em particular | <input type="checkbox"/> | |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

22. Relaciona algumas das seguintes situações com o processo de degradação do solo/ desertificação, na ilha?

	Sim	Não	
1. Uso inadequado do solo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
2. Uso excessivo de recursos naturais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
3. Secas prolongadas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
4. Monocultura cerealífera	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
5. Pastoreio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
6. Abandono das actividades agrícola/ pecuária/silvícola	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
7. Impermeabilização dos solos (ocupação dos terrenos para construção civil)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
8. Poluição (contaminação do solo e dos aquíferos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
9. Turismo/recreio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
10. Outra?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Qual e Porquê? _____
11. Todas as mencionadas	<input type="checkbox"/>		
12. Nenhuma das mencionadas	<input type="checkbox"/>		
99. Não sabe/ Não responde	<input type="checkbox"/>		

VALORIZAÇÃO DO COBERTO VEGETAL

23. Considera que a Valorização do Coberto Vegetal da ilha de Porto Santo possa ser uma medida importante de combate à desertificação?

1. Sim	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
2. Não	<input type="checkbox"/>	Porquê? _____
99. Não sabe/ Não responde	<input type="checkbox"/>	

24. Conhece quais as espécies vegetais que faziam parte do coberto vegetal da ilha quando esta foi descoberta (espécies nativas)?

1. Sim	<input type="checkbox"/>
2. Não	<input type="checkbox"/>
99. Não sabe/ Não responde	<input type="checkbox"/>

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 25)

24.1. Se respondeu sim, assinala, das seguintes, quais eram essas espécies nativas?

1. Oliveira Brava ou Zambujeiro (<i>Olea europaea</i> ssp. <i>maderensis</i>)	<input type="checkbox"/>
2. Oliveira comum (<i>Olea europaea</i>)	<input type="checkbox"/>
3. Zimbro ou Zimbreiro (<i>Juniperus phoenicea</i>)	<input type="checkbox"/>
4. Tamargueira ou Cedro salgado (<i>Tamarix gallica</i>)	<input type="checkbox"/>
5. Marmulano (<i>Sideroxylon marmulano</i>)	<input type="checkbox"/>
6. Palmeira (<i>Phoenix canariensis</i>)	<input type="checkbox"/>
7. Pinheiro do alepo (<i>Pinus halepensis</i>)	<input type="checkbox"/>

- | | | |
|--|--------------------------|-------------|
| 8. Loureiro (<i>Laurus azorica</i>) | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Dragoeiro (<i>Dracaena draco</i>) | <input type="checkbox"/> | |
| 10. Cedro de Monterey (<i>Cupressus macrocarpa</i>) | <input type="checkbox"/> | |
| 11. Urze (<i>Erica scoparia</i> ssp. <i>maderincola</i>) | <input type="checkbox"/> | |
| 12. Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>) | <input type="checkbox"/> | |
| 13. Tabaibeira (<i>Opuntia tuna</i>) | <input type="checkbox"/> | |
| 14. Nenhuma das anteriores | <input type="checkbox"/> | |
| 15. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

25. Qual a evolução do coberto vegetal da ilha do Porto Santo?

- | | | |
|---|--------------------------|-------------|
| 0. não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. cada vez mais escasso | <input type="checkbox"/> | |
| 2. cada vez mais abundante | <input type="checkbox"/> | |
| 3. mais diversificado (com mais espécies diferentes) | <input type="checkbox"/> | |
| 4. menos diversificado (com poucas espécies diferentes) | <input type="checkbox"/> | |
| 5. ardeu | <input type="checkbox"/> | |
| 6. foi tudo abandonado | <input type="checkbox"/> | |
| 7. manteve-se inalterado | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

26. Actualmente, como classifica o coberto vegetal da ilha do Porto Santo?

- | | | |
|--|--------------------------|-------------|
| 1. Abundante, com varias espécies | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Abundante, com uma ou duas espécies | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Pouco abundante, com várias espécies | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Pouco abundante, com uma ou duas espécies | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Escasso | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Degradado | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Exuberante, bem cuidado | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

27. Quais as zonas mais florestadas / arborizadas, actualmente?

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Zonas planas | <input type="checkbox"/> |
| 2. Zonas montanhosas | <input type="checkbox"/> |
| 3. Zonas costeiras | <input type="checkbox"/> |
| 4. Nenhuma | <input type="checkbox"/> |
| 5. Todas | <input type="checkbox"/> |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> |

28. Que medidas considera terem sido tomadas, pelas entidades competentes, para a preservação do coberto vegetal da ilha?

- | | | |
|--|--------------------------|-------------|
| 1. Repovoamento florestal recorrendo a espécies nativas | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Repovoamento florestal recorrendo a novas espécies (exóticas) | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Limpeza das zonas de coberto vegetal | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Incentivos à população para práticas agrícolas | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Retirada do gado ovino e caprino das serras | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Sensibilização das pessoas | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Não foram tomadas medidas | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

(Se não respondeu, repovoamento florestal, passe para a questão 30)

29. Nas medidas de repovoamento florestal, como é que estas têm sido aplicadas?

- | | | |
|---|--------------------------|--------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Com a mesma espécie, em zonas degradadas | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 2. Com espécies diferentes, em zonas degradadas | <input type="checkbox"/> | Quais? _____ |
| 3. Após um incêndio | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Quando as árvores são velhas | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Quando as árvores estão doentes | <input type="checkbox"/> | |
| 6. A regeneração é natural | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

30. Na globalidade, pode-se considerar que existem zonas florestadas na ilha, que se restringem essencialmente a resinosas em monocultura (zonas florestadas com uma única espécie). Concorda com esta afirmação?

- | | | |
|----------------------------|--------------------------|---|
| 1. Sim. | <input type="checkbox"/> | Quais são essas zonas e quais são as árvores presentes? _____ |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> | |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 32)

31. Assinale quais, na sua opinião, poderão ser as principais consequências de uma monocultura, por resinosas? (assinale 3 no máximo)

- | | | |
|--|--------------------------|-------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Maior predisposição ao ataque de pragas e doenças | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Boa conservação do solo e da água | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Elevado grau de combustibilidade dos materiais/incêndio | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Aumento da biodiversidade | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Perda de biodiversidade | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

32. Considera importante utilizar espécies nativas no repovoamento florestal, como combate ao problema de monocultura?

- | | | |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> | Quais e porquê? _____ |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> | Porquê? _____ |
| 3. Nunca pensou no assunto | <input type="checkbox"/> | |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

33. A Oliveira Brava ou Zambuieiro, é uma espécie nativa da ilha do Porto Santo, conhece esta árvore?

- | | | |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> | Em que parte da ilha observou? _____ |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 37)

34. A Oliveira Brava, assim como outras folhosas é fundamental para (assinale 3 no máximo):

- | | | |
|---|--------------------------|-------------|
| 1. Conservação de água e fornecimento de água ao solo | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Boa conservação do solo | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Empobrecimento do solo | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Combate da erosão do solo | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Aumento da biodiversidade | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Perda da biodiversidade | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

35. Na sua opinião, a Oliveira Brava ou Zambujeiro é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da ilha?

1. Sim ☐ Porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
99. Não sabe/ Não responde ☐

36. Os ensaios de propagação da Oliveira Brava por métodos tradicionais (estacaria e sementeira), têm-se mostrado pouco eficazes. Concorda com a aplicação de outros métodos mais avançados (ex: micropropagação/clonagem de plantas), para ajudar o processo de reflorestação?

1. Sim ☐ Porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
3. Nunca pensou no assunto ☐
99. Não sabe/ Não responde ☐

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 37)

36.1. Estaria disposto a dar algum contributo para preservar as áreas onde esta espécie fosse reintroduzida?

1. Sim ☐ Porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
99. Não sabe/ Não responde ☐

37. Como é que avalia o trabalho desenvolvido pela Direcção Regional de Florestas, relativamente à Florestação da ilha do Porto Santo?

0. Não se aplica ☐
1. Muito positivo ☐
2. Positivo ☐
3. Suficiente ☐
4. Insuficiente ☐
5. Negativo ☐
6. Muito negativo ☐
99. Não sabe/ Não responde ☐

37.1. Porquê? _____

38. No seu dia a dia, tem alguma preocupação com as questões apresentadas neste inquérito?

39. Gostaria de fazer mais algum comentário, no âmbito destes temas?

Anexo III

**Guião do inquérito por questionário aos visitantes
da Ilha de Porto Santo (IQV)**
(versões em língua portuguesa e em língua Inglesa)

INQUÉRITO
- VALORIZAÇÃO DO COBERTO VEGETAL EM ÁREAS AMBIENTALMENTE SENSÍVEIS –
- O EXEMPLO DA ILHA DE PORTO SANTO –

N.º de Inquérito _____

O presente Inquérito, é realizado com o apoio da Câmara Municipal do Porto Santo, e destina-se a um trabalho de investigação para realização de um Doutoramento na Universidade de Aveiro, intitulado:

“Estratégias para a Valorização do Coberto Vegetal da Ilha do Porto Santo”.

Pedia a melhor colaboração no seu preenchimento, agradecendo desde já o tempo que puder disponibilizar.

CARACTERIZAÇÃO GERAL

1. Origem e estadia

3. Nacionalidade : _____

4. Residência permanente : _____

5. Alojamento na Ilha :

a. Hotel ☐

b. Residencial/Pensão ☐

c. Campismo ☐

d. Casa/apartamento própria ☐

e. Casa/apartamento arrendada ☐

f. Outra ☐ Qual? _____

2. Idade (anos)

1. 16 - 20 ☐

2. 20 - 29 ☐

3. 30 - 39 ☐

4. 40 - 49 ☐

5. 50 - 59 ☐

6. 60 - 69 ☐

7. > 70 ☐

3. Sexo

1. Feminino ☐

2. Masculino ☐

4. Estado Civil

1. Solteiro ☐

2. Casado ☐

3. Viúvo ☐

4. Divorciado/ Separado ☐

5. União de Facto ☐

5. Nível de Escolaridade

1. Analfabeto ☐

2. Sabe ler e escrever sem frequentar a escola ☐

3. 1.º Ciclo do Ensino Básico ☐

4. 2.º Ciclo do Ensino Básico ☐

5. 3.º Ciclo do Ensino Básico ☐

6. Ensino Secundário ☐

7. Bacharelato ☐

8. Ensino Superior ☐

9. Outro. Qual? _____ ☐

6. Condição perante o trabalho

- | | |
|--|--------------------------|
| 1. Exerce uma actividade económica | <input type="checkbox"/> |
| 2. Exerce mais de uma actividade económica | <input type="checkbox"/> |
| 3. Desempregado | <input type="checkbox"/> |
| 4. Estudante | <input type="checkbox"/> |
| 5. Doméstico | <input type="checkbox"/> |
| 6. Reformado | <input type="checkbox"/> |
| 7. Incapacitado perante o trabalho | <input type="checkbox"/> |
| 8. Outra. Qual? _____ | <input type="checkbox"/> |

7. Profissão Actual ou Última (no caso de estar reformado ou desempregado)?

8. Quantas vezes já visitou a ilha de Porto Santo?

- | | | |
|---------------|--------------------------|----------------|
| 1. Uma vez | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Duas vezes | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Três vezes | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Mais | <input type="checkbox"/> | Quantas? _____ |

9. Ao visitar a ilha de Porto Santo, o que lhe suscita mais interesse? (Assinale 3)

- | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------|
| 1. o clima | <input type="checkbox"/> | |
| 2. a praia | <input type="checkbox"/> | |
| 3. a paisagem | <input type="checkbox"/> | |
| 4. geologia / geomorfologia | <input type="checkbox"/> | |
| 5. a cultura | <input type="checkbox"/> | |
| 6. a gastronomia | <input type="checkbox"/> | |
| 7. praticar desportos | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Todos os anteriores | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Outros. | <input type="checkbox"/> | Quais? _____ |

ÁREAS AMBIENTALMENTE SENSÍVEIS / DESERTIFICAÇÃO

10. Já ouviu falar em áreas ambientalmente sensíveis?

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 11)

10.1. O que entende por áreas ambientalmente sensíveis?

11. Já ouviu falar em degradação do solo / desertificação?

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 15)

11.1. O que entende por degradação do solo / desertificação?

12. Na globalidade, quais as causas que atribui ao processo de degradação do solo / desertificação?

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. São só devidas à natureza | <input type="checkbox"/> | |
| 2. São só devidas à acção do Homem | <input type="checkbox"/> | Especifique? _____ |
| 3. Devidas à acção do Homem e da natureza | <input type="checkbox"/> | Especifique? _____ |
| 4. São só devidas à vontade de Deus | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

13. Quais as consequências do processo de desertificação?

- | | | |
|--|--------------------------|-------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Degradação das populações animais e vegetais | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Degradação do solo / erosão | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Degradação das condições hidrológicas (águas superficiais e subterrâneas) | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Despovoamento | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

14. O conhecimento que adquiriu sobre os problemas de desertificação, provém fundamentalmente de:

- | | | |
|---|--------------------------|-------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. meios de comunicação social (TV; Rádio; Jornais; etc.) | <input type="checkbox"/> | |
| 2. conhecimento técnico | <input type="checkbox"/> | |
| 3. conversas com familiares e amigos | <input type="checkbox"/> | |
| 4. vivência do problema | <input type="checkbox"/> | |
| 5. pelo contacto directo com a ilha de Porto Santo | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

15. Considera que a ilha do Porto Santo é uma área ambientalmente sensível?

- | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> | Porquê? _____ |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> | Porquê? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 19)

15.1. Se respondeu sim, considera que a ilha sofreu degradação ambiental / desertificação?

- | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------------|
| 1. Sim | <input type="checkbox"/> | Porquê? _____ |
| 2. Não | <input type="checkbox"/> | Porquê? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

16. Quais as causas que atribui ao processo de degradação do solo / desertificação, na ilha?

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. São só devidas à natureza | <input type="checkbox"/> | |
| 2. São só devidas à acção do Homem | <input type="checkbox"/> | Especifique? _____ |
| 3. Devidas à acção do Homem e da natureza | <input type="checkbox"/> | Especifique? _____ |
| 4. São só devidas à vontade de Deus | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

17. De que forma é que o processo de desertificação tem afectado a ilha do Porto Santo?

- | | | |
|--|--------------------------|--------------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Ainda não afectou | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Agravamento da erosão | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Degradação dos solos | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Escassa vegetação | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Perda de biodiversidade | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Abandono da agricultura | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Recursos naturais limitados (água, solo, madeira, etc.) | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Fuga da população mais jovem para centros urbanos | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Vão afectar no futuro | <input type="checkbox"/> | Especifique: _____ |
| 10. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

(Se respondeu que “ainda não afectou”, passe para a questão 20)

18. Quais as medidas necessárias para atenuar as consequências do processo de desertificação? (Assinale 6)

- | | | |
|--|--------------------------|-------------|
| 0. Não se aplica | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Já não há nada a fazer | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Não se pode fazer nada | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Recuperação e conservação do coberto vegetal | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Gestão das águas de escorrência | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Retirada de gado das serras | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Protecção da paisagem | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Aplicação de políticas de ordenamento do território | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Incentivos às populações | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Aplicação de multas e coimas | <input type="checkbox"/> | |
| 10. Sensibilização das pessoas | <input type="checkbox"/> | |
| 11. Voltar a fazer as coisas como antigamente | <input type="checkbox"/> | |
| 12. Outra. | <input type="checkbox"/> | Qual? _____ |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

19. Tem sentido que a acção humana tem afectado alguns dos seguintes componentes ambientais, na ilha do Porto Santo? Assinale os 4 que considera mais afectados e diga de que modo foi afectado.

- | | | |
|--|--------------------------|---------------------------|
| 1. Solo | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 2. Vegetação (Flora) | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 3. Fauna | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 4. Sistema dunar | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 5. Recursos hídricos | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 6. Paisagem (valores culturais e históricos) | <input type="checkbox"/> | De que modo? _____ |
| 7. Outra | <input type="checkbox"/> | Qual e de que modo? _____ |
| _____ | | |
| 8. Não sentiu nenhuma degradação | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Não sentiu em nenhuma em particular | <input type="checkbox"/> | |
| 99. Não sabe/ Não responde | <input type="checkbox"/> | |

VALORIZAÇÃO DO COBERTO VEGETAL

20. Considera que a Valorização do Coberto Vegetal da ilha de Porto Santo possa ser uma medida importante de combate à desertificação?

1. Sim ☐ Porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
99. Não sabe/ Não responde ☐

21. Como classifica o coberto vegetal da ilha do Porto Santo?

1. Abundante ☐
2. Pouco abundante ☐
3. Escasso ☐
4. Outra ☐ Qual? _____
99. Não sabe/ Não responde ☐

22. Quais as zonas da ilha mais florestadas / arborizadas, actualmente?

1. Zonas planas ☐
2. Zonas montanhosas ☐
3. Zonas costeiras ☐
4. Nenhuma ☐
5. Todas ☐
99. Não sabe/ Não responde ☐

23. Considera ser uma medida importante, utilizar espécies nativas no repovoamento florestal?

1. Sim ☐ Quais e porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
3. Nunca pensou no assunto ☐
99. Não sabe/ Não responde ☐

24. A Oliveira Brava ou Zambujeiro, é uma espécie nativa da ilha do Porto Santo (existia aquando da descoberta da ilha), conhece esta árvore?

1. Sim ☐
2. Não ☐
3. Não sabe/ Não responde ☐

(Se respondeu negativamente, passe para a questão 26)

24.1. Na sua opinião, a Oliveira Brava é uma boa espécie para reintroduzir na florestação da ilha?

1. Sim ☐ Porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
99. Não sabe/ Não responde ☐

25. A propagação da Oliveira Brava por estacaria e por sementeira, tem-se mostrado pouco eficaz. Concorde com a aplicação de outros métodos de multiplicação desta espécie (ex. micropropagação/clonagem de plantas), para ajudar o processo de reflorestação?

1. Sim ☐ Porquê? _____
2. Não ☐ Porquê? _____
3. Nunca pensou no assunto ☐
99. Não sabe/ Não responde ☐

26. No seu dia a dia, tem alguma preocupação com as questões apresentadas neste inquérito?

QUESTIONNAIRE

- VALORIZATION OF VEGETATION IN ENVIRONMENTALLY SENSITIVE AREAS– - THE ISLAND OF PORTO SANTO AS A CASE STUDY –

This inquiry, supported by the Porto Santo City Council, is a preparatory research work for a doctorate to be held at Aveiro University (Portugal mainland) and entitled:

“Strategies for the Valorisation of the Vegetal Cover on the Porto Santo Island”

We kindly ask for your collaboration, sparing a few minutes of your stay filling in the annexed questionnaire. We gratefully acknowledge your help.

Inquiry nr _____

GENERAL CHARACTERIZATION

1. Nationality and Accommodation

1. Nationality: _____
2. Local of Residence: _____
3. Accommodation on the island:
 - a. Hotel ☐
 - b. Boarding-house ☐
 - c. Camping ☐
 - d. Own house or apartment ☐
 - e. Rented house or apartment ☐
 - f. Other ☐ Specify: _____

2. Age (years old)

1. 16 - 20 ☐
2. 20 - 29 ☐
3. 30 - 39 ☐
4. 40 - 49 ☐
5. 50 - 59 ☐
6. 60 - 69 ☐
7. > 70 ☐

3. Gender

1. Female ☐
2. Male ☐

4. Marital status

1. Single ☐
2. Married ☐
3. Widowed ☐
4. Divorced ☐
5. Other ☐ Specify: _____

5. Academic qualifications / educational levels _____

6. Labour status

1. Employed ☐
3. Unemployed ☐
4. Student ☐
5. House-wife/husband ☐
6. Retired ☐
7. Incapacitated for work ☐
8. Other ☐ Specify: _____

7. Current (or last) job?

8. How many times have you visited Porto Santo island?

8.1. Once ☐

8.2. Twice ☐

8.3. Three times ☐

8.4. More ☐ Specify: _____

9. Why did you choose to visit Porto Santo island? It's because of: (choose 3 options)

10. The weather ☐

11. The beach ☐

12. The landscape / natural resources ☐

13. Geology/geomorphology ☐

14. Cultural resources ☐

15. Gastronomy ☐

16. Sports practice ☐

17. All the above ☐

18. Others ☐ Specify: _____

ENVIRONMENTALLY SENSITIVE AREAS / DESERTIFICATION

10. Do “environmentally sensitive areas” mean anything to you?

1. Yes ☐

2. No ☐

99. Does not know/ does not answer ☐

(If you answered NO, go to question 11)

10.2. What are “environmentally sensitive areas”?

11. Does desertification / degradation of soil mean anything to you?

1. Yes ☐

2. No ☐

99. Does not know/ does not answer ☐

(If you answered NO, go to question 15)

11.1. What is desertification / soil degradation?

12. What causes desertification / soil degradation?

0. Not applicable ☐

1. Nature ☐

2. Human action ☐ Specify? _____

3. Nature and man ☐ Specify? _____

4. Supernatural causes ☐

5. Other ☐ Specify? _____

99. Does not know/ does not answer ☐

13. What are the consequences of desertification? (choose 4 options)

- 0. Not applicable ☐
- 1. Degradation of fauna and flora ☐
- 2. Degradation of soil / erosion ☐
- 3. Degradation of hydrologic resources (underground and superficial) ☐
- 4. Depopulation / loss of income ☐
- 5. Other. ☐ Specify? _____
- 99. Does not know / does not answer ☐

14. The knowledge you acquired on desertification problems comes basically from:

- 0. Not applicable ☐
- 1. the media (TV, radio, newspapers, etc.) ☐
- 2. technical / professional knowledge ☐
- 3. talking with relatives and friends ☐
- 4. experience of the problem ☐
- 5. direct contact with the island of Porto Santo ☐
- 6. Other. ☐ Specify? _____
- 99. Does not know / does not answer ☐

15. In your opinion, is Porto Santo island an environmentally sensitive area?

- 1. Yes ☐ Why? _____
 - 2. No ☐ Why? _____
 - 99. Does not know/ does not answer ☐
- (If you answered NO, go to question 19)

15.1. If you answered yes, do you think the island has been undergoing environmental degradation / desertification?

- 1. Yes ☐ Why? _____
- 2. No ☐ Why? _____
- 99. Does not know / does not answer ☐

16. In your opinion, what causes desertification / soil degradation on the island?

- 0. Not applicable ☐
- 1. Due to nature ☐
- 2. Due to direct action of man ☐ Specify? _____
- 3. Due to nature and man ☐ Specify? _____
- 4. Due to supernatural causes ☐
- 5. Other. ☐ Specify? _____
- 99. Does not know / does not answer ☐

17. In which way has desertification affected Porto Santo island?

- | | | |
|--|--------------------------|----------------|
| 0. Not applicable | <input type="checkbox"/> | |
| 1. It did not affect it yet | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Intensification of erosion | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Soil degradation | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Scarce vegetation | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Loss of biodiversity | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Land abandonment | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Loss of natural resources (water, soil, wood, etc.) | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Exodus of active population to urban areas | <input type="checkbox"/> | |
| 9. It will affect it in the future | <input type="checkbox"/> | Specify: _____ |
| 10. Other. | <input type="checkbox"/> | Specify _____ |
| 99. Does not know/ does not answer | <input type="checkbox"/> | |

(If you answered: "It did not affect it yet", go to question 20)

18. Which mitigation measures should be implemented to stop the desertification? (choose 6 options)

- | | | |
|--|--------------------------|---------------|
| 0. Not applicable | <input type="checkbox"/> | |
| 1. Doing nothing | <input type="checkbox"/> | |
| 2. Nothing can be done | <input type="checkbox"/> | |
| 3. Recuperation and conservation of the vegetation | <input type="checkbox"/> | |
| 4. Management of surface waters | <input type="checkbox"/> | |
| 5. Withdraw small ruminants from hills | <input type="checkbox"/> | |
| 6. Landscape protection | <input type="checkbox"/> | |
| 7. Land use planning | <input type="checkbox"/> | |
| 8. Incentives to farmers | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Taxes | <input type="checkbox"/> | |
| 10. People concretization / participation | <input type="checkbox"/> | |
| 11. Return to old traditional practices | <input type="checkbox"/> | |
| 12. Other. | <input type="checkbox"/> | Specify _____ |
| 99. Does not know/ does not answer | <input type="checkbox"/> | |

19. Do you think that human action has affected environmental components on Porto Santo island?

(Choose 4 options).

- | | | |
|--|--------------------------|---------------------------------------|
| 1. Soil | <input type="checkbox"/> | In which way? _____ |
| 2. Vegetation (Flora) | <input type="checkbox"/> | In which way? _____ |
| 3. Fauna | <input type="checkbox"/> | In which way? _____ |
| 4. Dune ecosystem | <input type="checkbox"/> | In which way? _____ |
| 5. Water resources | <input type="checkbox"/> | In which way? _____ |
| 6. Landscape | <input type="checkbox"/> | In which way? _____ |
| 7. Other | <input type="checkbox"/> | Specify and state in which way? _____ |
| | | |
| 8. Did not feel any degradation | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Did not feel that human action affected any environmental component | <input type="checkbox"/> | |
| 99. Does not know / does not answer | <input type="checkbox"/> | |

VALORISATION OF VEGETATION AREAS

20. Do you consider that the valorisation of vegetation areas is an important measure to minimize the desertification process?

1. Yes ☐ Why? _____
 2. No ☐ Why? _____
 99. Does not know/ does not answer ☐

21. How do you classify the vegetation areas of the island of Porto Santo?

1. Abundant ☐
 2. Not abundant ☐
 3. Scarce ☐
 4. Other. ☐ Specify: _____
 99. Does not know/ does not answer ☐

22. At present, which areas do you consider as being more afforested on the island?

1. Planes and plateaux ☐
 2. Hills ☐
 3. Coastal areas ☐
 4. None ☐
 5. All of the above ☐
 99. Does not know / does not answer ☐

23. Do you think that using native tree species during the afforestation process is an important measure?

1. Yes ☐ Why? _____
 2. No ☐ Why? _____
 3. Never thought about that ☐
 99. Does not know/ does not answer ☐

24. Wild Olive or 'Zambujeiro' is a native species to the island of Porto Santo; do you know that tree?

1. Yes ☐
 2. No ☐
 99. Does not know / does not answer ☐

(If you answered NO, go to question 26)

24.1. In your opinion, is wild olive a good species to use during the afforestation process?

1. Yes ☐ Why? _____
 2. No ☐ Why? _____
 99. Does not know/ does not answer ☐

25. Wild olive propagation by traditional methods (e.g. greenhouse regeneration from stem cuttings), appears to be extremely inconsistent and without reproducibility, up to the moment. Do you think that the application of new methods on the propagation of these trees, such as micropropagation / cloning plants, could help the afforestation process?

1. Yes ☐ Why? _____
 2. No ☐ Why? _____
 3. Never thought about that ☐
 99. Does not know/ does not answer ☐

26. In your daily life, are you concerned with the issues presented in this questionnaire?

Anexo IV

**Guião do inquérito por entrevista (IE) efectuada
às entidades e aos especialistas**

INQUÉRITO POR ENTREVISTA

“ESTRATÉGIAS PARA A VALORIZAÇÃO DO COBERTO VEGETAL DA ILHA DE PORTO SANTO”

1. **Considera que a ilha é uma área ambientalmente sensível ou seja, sofreu um processo de desertificação ao longo dos tempos?**
2. **Quais as causas que atribui ao processo de desertificação que a ilha sofreu ao longo dos tempos? E de que forma é que isso tem afectado a ilha de Porto Santo?**
3. **Se respondeu afirmativamente às perguntas anteriores, na sua opinião quais as medidas necessárias para atenuar as consequências do processo de desertificação da ilha?**
4. **Como avalia a evolução do Coberto Vegetal da ilha de Porto Santo, ao longo dos tempos?**
5. **Como classifica o coberto vegetal da ilha actualmente?**
6. **Verifica-se que, o coberto florestal actual da Ilha do Porto Santo é, por excelência, um coberto de intervenção humana, notando-se sem dúvida o grande esforço por parte das entidades competentes, nomeadamente a DRF. Contudo, facilmente se identificam as essências florestais mais abundantes existentes nas zonas arborizadas, nomeadamente o Pinheiros (*Pinus halepensis*) e Cedros (*Cupressus macrocarpa*), o que nos remete assim para um problema de monocultura. **Concorda que a ilha sofra de um problema de monocultura?****
7. **Considerando estes aspectos de desertificação da ilha e o problema da monocultura que a ilha enfrenta, quais as medidas que considera deverão ser tomadas no sentido de atenuar estes problemas?**
8. **Relativamente aos esforços desenvolvidos em programas de reflorestação, e considerando a escassez de água que se faz sentir em Porto Santo, na sua opinião como deverá ser feita a gestão da rega em zonas florestadas e a florestar?**
9. **Concorda que a utilização de espécies indígenas/nativas da ilha de Porto Santo, deve ser prioritária, nos programas de reflorestação em curso ou na sua opinião poderão ser utilizadas espécies exóticas, isto é originárias de outros locais?**

- 10.** No âmbito da investigação que tenho vindo a desenvolver, pretendo, através de micropropagação, estabelecer in vitro plantas de oliveira brava ou zambujeiro (*Olea maderensis*), multiplicar, enraizar e aclimatizar essas plantas e comparar a estabilidade fenotípica e genética das plantas micropropagadas. **Qual a sua opinião relativamente à aplicação de novas tecnologias (micropropagação de plantas) no âmbito dos processos de reflorestação da ilha?**
- 11.** Concorda, que a oliveira brava ou zambujeiro (*Olea maderensis*) possa ser uma espécie importante a ser utilizada em programas de reflorestação da ilha de Porto Santo? Porquê?
- 12.** Um dos factores que impedem alargar o repovoamento florestal na ilha é a existência de terrenos particulares que se encontram actualmente em estado avançado de degradação biofísica, pelo que seria urgente a expropriação destes terrenos afim de serem declarados de utilidade pública. Como deverá, na sua opinião, ser ultrapassado este problema?
- 13.** Como é que encara o desenvolvimento que o Porto Santo tem tido nestes últimos anos? Acha que os projectos desenvolvidos têm tido em atenção a sustentabilidade ambiental, ou sente que, por outro lado existe algum conflito entre a protecção do ambiente e o desenvolvimento económico (que possa estar a interferir com o equilíbrio dos ecossistemas)?

Agradeço a atenção e disponibilidade dispensada, para responder a este inquérito, ferramenta que será muito importante no meu trabalho de investigação.

Com os melhores cumprimentos

Gina Brito

Anexo V

Local de distribuição e número de IQV respondidos.

Tabela 1 (Anexo V) – Estratégia de distribuição e aplicação de inquéritos por questionário aos visitantes da Ilha de Porto Santo (IQV – versão em língua Portuguesa e língua Inglesa) e, número de IQV respondidos.

Estabelecimentos / outros	Nº IQV distribuídos	Nº IQV respondidos
Hotel INATEL	30 Port.	9
Hotel Lua Mar	40 Port. / 20 Inglês	22
Hotel Torre Praia	40 Port./ 20 Inglês	19
Hotel Praia Dourada	30 Port. / 20 Inglês	6
Hotel Porto Santo	25 Port. / 20 Inglês	14
Hotel Vila Baleira	40 Port. / 30 Inglês	8
Quinta do Serrado	30 Port. / 35 Inglês	13
Quinta das Palmeiras	20 Port. / 15 Inglês	7
CEREPOSA	30 Port. / 20 Inglês	0
Pensão Central	20 Port. / 20 Inglês	0
Residencial Areia Dourada	20 Port. / 20 Inglês	0
Passeio: “Geologia no Verão” Programa: “CIENCIA VIVA”	25 Port.	16
Outros (cafés, esplanadas, etc.)	50 Port.	23
TOTAL	400 Port. / 230 Inglês	137

Anexo VI

**Preocupações e comentários dos residentes e dos visitantes
no âmbito dos temas abordados nos IQR e nos IQV**

Tabela 1 (Anexo VI) – Principais preocupações apresentadas pelos residentes, relacionadas com as questões do IQR.

<i>No seu dia a dia, tem alguma preocupação com as questões apresentadas neste inquérito?</i>	N	(%)
• Preservar a natureza / não destruir a vegetação (ex. zonas florestadas, sistema dunar, jardins públicos)	26	14,4
• Poluição é preocupante (ex. limpeza das zonas florestadas, maior separação dos resíduos, existência de resíduos céu aberto)	23	12,7
• Importante reflorestar adequadamente (com espécies nativas) para diversificar a flora e para o equilíbrio dos ecossistemas da Ilha	12	6,6
• Por ser importante a existência de vegetação preservo/mantenho um jardim em casa	12	6,6
• Reforçar a reflorestação é importante para a conservação de água no solo e a regeneração natural de herbáceas	11	6,1
• Melhorar o armazenamento de águas pluviais para rega da vegetação existente (ex. armazenar água em casa para rega do jardim)	11	6,1
• Embora nunca se tivesse debruçado muito sobre estas questões, por não ser da área, considera serem de grande importância	11	6,1
• Existência de zonas muito secas/desertificadas	10	5,5
• Embora seja importante o desenvolvimento económico da ilha, deverão ser reservadas áreas para aumentar o coberto vegetal	9	5,0
• Importante a preservação dos solos e de todos os recursos naturais da ilha	8	4,4
• Preocupa-se com tudo o que está relacionado com causas ambientais/naturais	6	3,3
• A exploração de pedreiras representa um atentado à harmonia ambiental da ilha	2	1,1
• Preocupa o facto de deixarem de construir paredes de pedra/muros de protecção para travar a erosão	2	1,1
• Por se preocupar tenta corresponder às acções de sensibilização através de cuidados preventivos	1	0,6
• NS/NR	37	20,4
TOTAL	181	100,0

Tabela 2 (Anexo VI) – Comentários apresentados pelos residentes no âmbito dos temas abordados no IQR.

<i>Gostaria de fazer mais algum comentário, no âmbito destes temas apresentados no inquérito?</i>	N	(%)
• A sensibilização da população deverá ser uma constante (ex. elaboração de inquéritos como este, conferências)	20	8,7
• O que for feito em prol da preservação e desenvolvimento da ilha ao nível ambiental será importante no futuro	16	7,0
• Conciliar o crescimento urbano com a preservação da natureza, é importante tanto para a população como para o turismo	11	4,8
• Gostaria de ver o Porto Santo com uma paisagem mais cuidada (ex. maior coberto vegetal, jardins, mais agricultura)	8	3,5
• Não sente preocupação por parte dos políticos para estas questões	8	3,5
• Deverão melhorar a captação e o armazenamento das águas pluviais (quando chove muita água é perdida para o mar)	7	3,1
• Seria importante um maior investimento a nível ambiental (ex. zona norte da ilha onde os solos estão mais empobrecidos)	5	2,2
• Deveria haver mais incentivos à população para a criação de novas práticas agrícolas	5	2,2
• Continuação do trabalho que tem sido desenvolvido	4	1,7
• É utilizada muita água para rega do campo de golfe e pouca na reflorestação de novas áreas	4	1,7
• Os proprietários dos terrenos devem ter a preocupação em mantê-los limpos e com vegetação de modo a proteger da erosão	3	1,3
• As zonas florestadas fazem bem à saúde (ex. ajuda a respirar melhor)	3	1,3
• Considera importante a valorização/recuperação de alguns aspectos culturais (ex. fontanários, Fonte de Areia)	3	1,3
• A manutenção e funcionamento dos ecossistemas dependem do equilíbrio entre a fauna e a flora	2	0,9
• O equilíbrio dos ecossistemas na ilha contribui para a qualidade de vida da população residente e visitante	1	0,4
• NS/NR	129	56,3
TOTAL	229	100,0

Tabela 3 (Anexo VI) – Principais preocupações apresentadas pelos visitantes, relacionadas com as questões do IQV.

Quais as suas preocupações?	No seu dia a dia, tem alguma preocupação com as questões apresentadas neste inquérito?						Total	
	Sim		Não		Alguma		N	(%)
	N	(%)	N	(%)	N	(%)		
• Todos são responsáveis pela preservação do ambiente	7	9,0	-	-	-	-	7	7,5
• Preocupa-se muito porque trabalha na área ligada ao meio ambiente/formação de base	5	6,4	-	-	-	-	5	5,4
• Preocupa-se com tudo o que está relacionado com causas ambientais/naturais	4	5,1	-	-	-	-	4	4,3
• Preocupa-se com o meio ambiente e a sua destruição gratuita a favor de construções de luxo (e.g. nas dunas)	4	5,1	-	-	-	-	4	4,3
• Preservar a natureza/não destruir a vegetação/protecção da paisagem (ex. zonas florestadas, sistema dunar)	4	5,1	-	-	-	-	4	4,3
• Tenta corresponder às acções de sensibilização através de cuidados preventivos (e.g. separação de resíduos, consumo de água)	4	5,1	-	-	-	-	4	4,3
• Estas questões são fundamentais para o equilíbrio dos ecossistemas e do ambiente	3	3,8	-	-	-	-	3	3,2
• Estas questões são fundamentais para o desenvolvimento sustentável	3	3,8	-	-	-	-	3	3,2
• Preocupa-se com o que se passa globalmente no Planeta/questões cruciais para a sobrevivência do planeta	2	2,6	-	-	2	15,4	4	4,3
• Gostaria de ver o Porto Santo com uma paisagem mais cuidada (e.g. maior coberto vegetal, jardins, menos pedreiras)	2	2,6	-	-	-	-	2	2,2
• Preocupa-se com a pressão do turismo sobre o ambiente	2	2,6	-	-	-	-	2	2,2
• Preocupa-se com as questões relacionadas com a floresta, flora e fauna, não de Porto Santo mas sim do local onde vive	1	1,3	-	-	1	7,7	2	2,2
• Considera importante a existência de espaços verdes nas cidades, pois a vegetação é importante para o ser humano	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• O desenvolvimento económico a favor do turismo não é acompanhado de ordenamento do território	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• Preocupa-se sobretudo com a desertificação física, que geralmente precede a desertificação humana	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• Questiona o porquê da reflorestação com pinheiros, pois apresentam elevado grau de combustibilidade, numa ilha tão árida	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• Preocupa-se com a existência de zonas muito secas/desertificadas	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• É urgente a plantação de árvores/arbustos acompanhado de acções de sensibilização para incentivar a rega destas áreas	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• É utilizada muita água para rega do campo de golfe e pouca na reflorestação de novas áreas	1	1,3	-	-	-	-	1	1,1
• Não se preocupa muito, pois no local onde vive não existem os problemas que existem no Porto Santo	-	-	1	50,0	3	23,1	4	4,3
• NS/NR	30	38,5	1	50,0	7	53,8	38	40,9
Total	78	100	2	100	13	100	93	100